

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE PROTEINA
POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION OF PROTEINS
SEMINARSKI RAD

ROBERT VALLA
PREDDIPLOMSKI STUDIJ MOLEKULARNE BIOLOGIJE
UNDERGRADUATE STUDY OF MOLECULAR BIOLOGY
MENTOR: DOC. DR. SC. JASMINA ROKOV PLAVEC

ZAGREB, 2018.

SADRŽAJ:

1. UVOD U POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE	3
1.1. Proteini i biosinteza proteina	3
1.2. Posttranslacijske modifikacije otvaraju nove mogućnosti proteinske biokemije	3
2. ZAUZIMANJE NATIVE KONFORMACIJE	5
2.1. Uvod	5
2.2. Samostalno smatanje proteina	5
2.3. Potpomognuto smatanje proteina	6
2.4. Stvaranje disulfidnih veza	9
3. PROCESIRANJE N–KRAJA.....	10
3.1. Uvod	10
3.2. Uklanjanje metionina s N–kraja.....	10
4. ACETILACIJA	12
4.1. Uvod u acetilaciju	12
4.2. Acetilacija N-kraja	12
4.3. Acetilacija lizina	14
4.4. Histoni i uloga acetilacije u regulaciji ekspresije gena eukariota	15
4.5. Primjeri drugih posljedica acetilacije proteina na bočnom ogranku lizina	17
5. FOSFORILACIJA	18
5.1. Uvod	18
5.2. Kinaze i fosfataze	18
5.3. Metabolički i signalni putevi predominantno su regulirani fosforilacijom	20
5.4. Primjeri fizioloških i staničnih uloga fosforilacije	22
6. GLIKOZILACIJA	23
6.1. Uvod u glikozilaciju, glikoproteini i proteoglikani	23
6.2. O–glikozilacija	24
6.3. N–glikozilacija	24
6.4. Ostali tipovi glikozilacije	26
7. PROTEOLIZA	28
7.1. Uvod i proteaze	28
7.2. Mehanizam grušanja krvi i komplement predstavljaju sustav inaktivnih proenzima.....	29
8. KONJUGACIJA S DRUGIM PROTEINIMA	31
8.1. Ubikvitinacija – mehanizam i učinci	31
8.2. Sumoilacija	34
8.3. Razgradnja proteina	35
9. ZAKLJUČAK	36
10. LITERATURA	37
11. SAŽETAK (SUMMARY).....	39

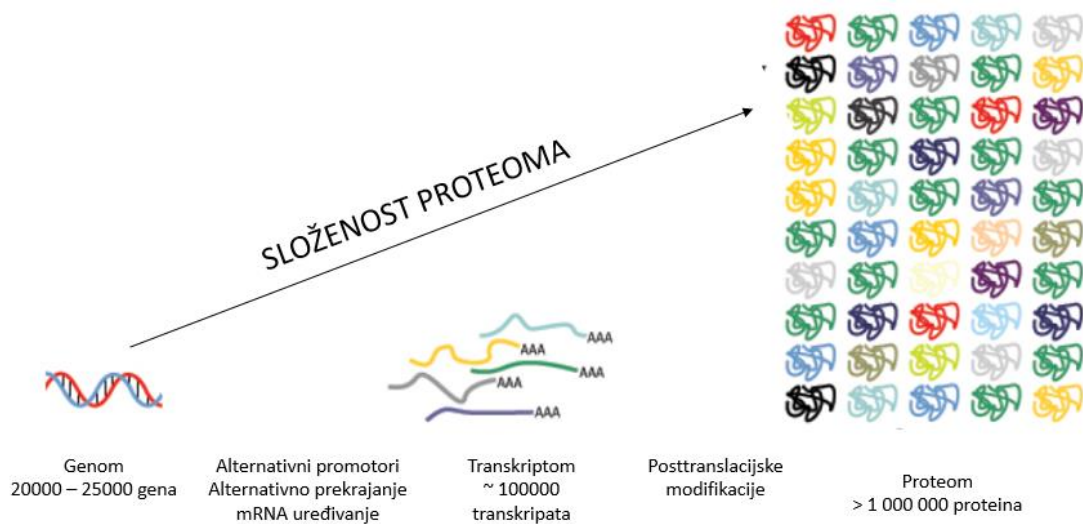
1. UVOD U POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE

1.1. Proteini i biosinteza proteina

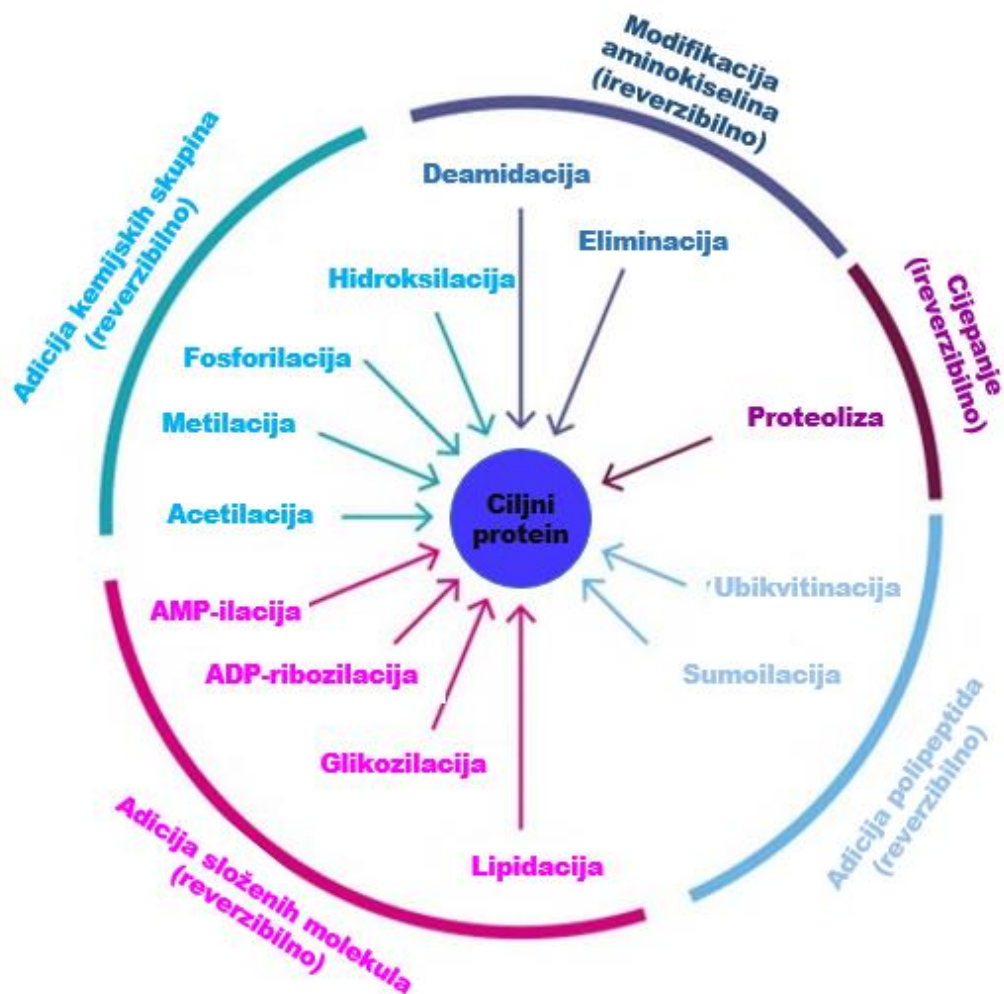
Proteini su najzastupljenije biološke makromolekule života. Nalazimo ih u svim stanicama i u svim dijelovima stanice. Proteini su makromolekule koje izvršavaju ogroman broj različitih funkcija u stanici, što je za očekivati iz toliko diverzitetne skupine bioloških makromolekula. Proteini su stoga vrlo složene molekule, no njihove gradivne jedinice relativno su jednostavne. Naime, svi proteini svih živih organizama građeni su od skupa 20 aminokiselina sveprisutnih u cijelom živom svijetu, kovalentno povezanih peptidnim vezama u linearnu molekulu. Stoga tih 20 aminokiselina možemo smatrati abecedom proteinske biokemije. Povezivanjem aminokiselina u različitom redoslijedu procesom biosinteze proteina stanice mogu proizvesti ogroman broj različitih proteina iz skromnog broja početnih preteča. Proces biosinteze proteina odvija se u citosolu stanice na strukturama zvanim ribosomi. To su ribonukleoproteinske strukture koje imaju ulogu kataliziranja stvaranja peptidne veze između pojedinih aminokiselina. Proteini su konačni produkti informacijskih puteva. Drugim riječima, slijed aminokiselina u pojedinom proteinu kolineran je slijedu nukleotida u genu koji kodira za taj protein u bakterijskom svijetu, odnosno slijedu nukleotida u procesiranoj molekuli mRNA nakon izrezivanja nekodirajućih odsječaka, odnosno introna. Kolinearnost DNA usmjerenja 5'→3' poklapa se s usmjerenjem proteina N-kraj → C-terminalni kraj. Biosinteza proteina sastoji se od aktivacije aminokiselina (esterifikacija na odgovarajuće molekule tRNA djelovanjem enzima aminoacil-tRNA-sintetaza), inicijacije (započinje prepoznavanjem START-kodona), elongacije (faza nastanka peptidnih veza), terminacije (nailazak na STOP-kodon i otpuštanje linearnog polipeptida s ribosoma) te faze dorade kojom nastaju nativni proteini.

1.2. Posttranslacijske modifikacije otvaraju nove mogućnosti proteinske biokemije

Zadnja faza u biosintezi proteina uključuje smatanje proteina i sve modifikacije koje će zajedno prevesti protein u biološki aktivnu formu. Ovim procesima protein se iz linearne forme prevodi u trodimenzijsku, aktivnu formu koju zovemo nativna konformacija proteina. Valja napomenuti da većina proteina svoju aktivnu biološku ulogu obavlja kao globularni protein, tako da su ove preinake vrlo bitne za funkciju tih proteina te bez njih život kakav danas poznajemo ne bi mogao postojati. Posttranslacijske modifikacije proteina (dalje u tekstu PTM) skup su svih kemijskih reakcija, odnosno preinaka proteina nakon njihove sinteze i otpuštanja s ribosoma. Postoji ogroman broj pojedinih PTM, a najčešće su cijepanje proteina na specifičnim mjestima te kovalentno dodavanje ili uklanjanje pojedinih malih molekula. Vrlo je važno zamijetiti da PTM značajno proširuju funkcionalnu raznolikost proteoma u stanici (Slika 1). Iako različitim kombinacijama povezivanja aminokiselina pri sintezi proteina nastaje ogroman broj različitih proteina u stanici, ta raznolikost ne opravdava broj proteina pronađenih u stanici¹. PTM stoga proširuju spektar funkcija proteina: omogućuju njihovu lokalizaciju u pojedine organele u stanici, regulaciju aktivnosti pojedinih proteina (osobito enzima) te njihovu interakciju s drugim molekulama u stanici. Većina PTM ima ulogu u signalizaciji. Pojedine PTM su reverzibilne (Slika 2), dok su pojedine ireverzibilne². Većina PTM se odvija neposredno nakon translacije, no neke se odvijaju i kasnije, ovisno o potrebi u stanici i organizmu (ovo se najviše odnosi na proteolitičke modifikacije proteina probavnog i imunološkog sustava). Slijedi opis smatanja proteina u stanici te pojedinih najčešćih PTM.



Slika 1: PTM znatno povećavaju funkcionalnu kompleksnost proteoma (preuzeto i prilagođeno prema ¹).



Slika 2: Pregled pojedinih posttranslacijskih modifikacija (preuzeto i prilagođeno prema ²).

2. ZAUZIMANJE NATIVNE KONFORMACIJE

2.1. Uvod

Prema jednoj definiciji, nativna konformacija proteina ona je konformacija u kojoj je ostvaren najveći mogući broj pojedinih nekovalentnih interakcija³. Drugim riječima, protein u nativnoj konformaciji najstabilniji je protein. Međutim, svaki protein postoji u biološkim uvjetima u jednoj ili nekoliko konformacija. Nekoliko stabilnih konformacija posebice se odnosi na enzime koji vezanjem svojih supstrata mogu promijeniti konformaciju. Da enzimi ne mogu postojati u više stabilnih konformacija, ne bi mogli vršiti svoju ulogu katalize kemijskih reakcija. Također, kristalizacija je pokazala da većina proteina postoji u nekoliko različitih konformacija zbog toga što se opetovanim ponavljanjima postupka kristalizacije pojedinog proteina dobivaju različiti rezultati. S tim saznanjima nativna konformacija može se također definirati kao svaka konformacija proteina u kojoj je on funkcionalan, odnosno aktivan. Konformacija proteina uvelike je stabilizirana nekovalentnim interakcijama. Novosintetizirani je protein linearan i kao takav, ostvaruje mnogo nekovalentnih interakcija s vodom, primarno vodikove veze. Tu valja spomenuti i pojam konformacijske entropije, odnosno fenomen da nesmotani protein ostane nesmotan jer se entropija smanjuje smatanjem proteina zbog toga što je protein u smotanom stanju znatno uređenije strukture od svog nesmotanog oblika. Sile koje održavaju protein u nativnoj konformaciji već su ranije spomenute nekovalentne interakcije (vodikove veze, ionske interakcije, hidrofobni učinak) te stvaranje disulfidnih veza. Pojedina kovalentna veza sama po sebi znatno više doprinosi stabilnosti proteina od pojedine nekovalentne interakcije, no nekovalentne interakcije u nativnom proteinu toliko su brojne da su one zapravo te koje dominiraju u održavanju stabilnosti nativne konformacije. Valja napomenuti da samo ostvarivanje vodikovih veza u smotanom proteinu nije pokretačka snaga smatanja. Naime, za svaku vodikovu vezu koja je nastala pri smatanju proteina, jedna vodikova veza između tog proteina i vode morala se potrgati, tako da ukupna razlika u slobodnoj energiji vodikovih veza između smotanog i nesmotanog proteina ne može biti pokretačka sila smatanja. Puno veću pokretačku silu smatanja predstavlja hidrofobni učinak. Naime, bočni ogranci hidrofobnih aminokiselina u nesmotanom stanju okruženi su tzv. solvacijskom ljuskom, visokoorganiziranom strukturom molekula vode, što smanjuje entropiju. Asociranjem hidrofobnih bočnih ogranka u unutrašnjosti proteina znatno se smanjuje uređenost vode, što predstavlja pozitivan porast entropije i stoga glavnu pokretačku silu u smatanju proteina, dok su na površini proteina smješteni polarni ili nabijeni bočni ogranci koji ostvaruju s vodom³.

2.2. Samostalno smatanje proteina

Ponuđene hipoteze samostalnog smatanja uključuju nasumično smatanje mehanizmom pokušaja i pogreške, hijerarhijski model smatanja (prvo se formiraju jednostavnije strukture, a zatim njihovom interakcijom nastaju složenije strukture unutar proteina) te model spontanog kolapsa proteina u trodimenzijski oblik (hidrofobni dijelovi proteina propadaju u unutrašnjost proteina)^{3,4}. Smatanje proteina nije spontano jer se proteini vrlo brzo smataju u stanici, a mehanizam pokušaja i pogreške već za male proteine daje toliki broj mogućih konformacija da se brzo došlo zaključka da to nije mehanizam smatanja; ovaj fenomen zove se Levinthalov paradoks⁴. Mali proteini s jednom domenom vjerojatno se smataju na isti način kao pojedine domene velikih proteina. Proučavanjem smatanja zaključilo se da su proteini programirani za učinkovito smatanje, što znači da proteini ne isprobavaju pojedinačno sve moguće konformacije, nego samo određen broj konformacija. Početno stanje proteina je denaturirano stanje, odnosno stanje inaktivnog proteina u linearnom obliku. Intrinzična konformacija sekundarnih i tercijarnih struktura proizlaze iz primarne strukture proteina te okoline u kojoj se protein nalazi. Ako se protein nalazi u vodi, uočava se tendencija zakopavanja hidrofobnih dijelova u unutarnje dijelove proteina. Ako se protein pak nalazi u nepolarnom otapalu, hidrofobni učinak gubi smisao⁴.

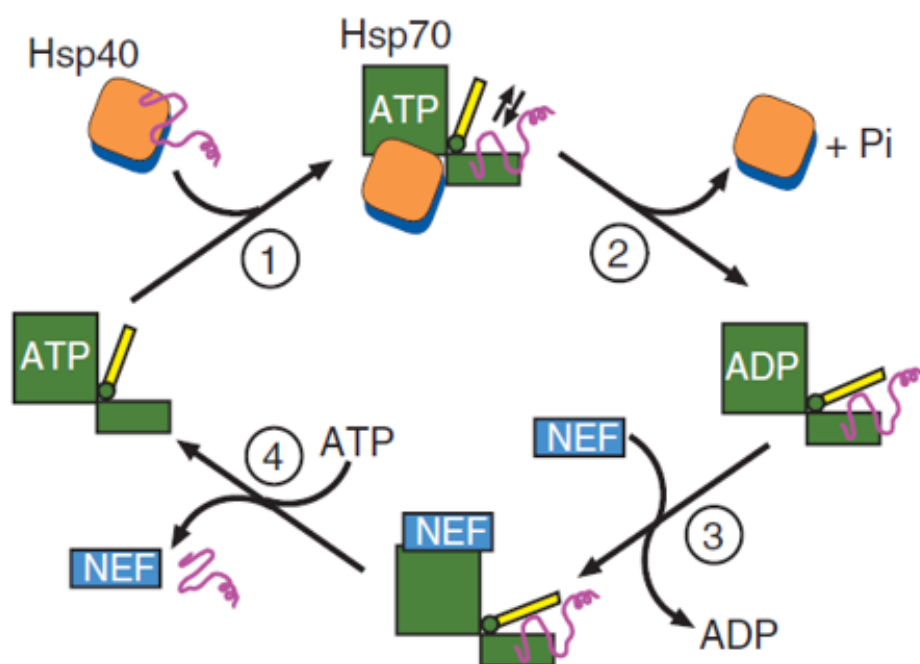
2.3. Potpomognuto smatanje proteina

Iako se pojedini mali proteini mogu smotati samostalno, većina proteina slaže se pomoću drugih proteina^{3, 5-7}. Te pomagačke proteine zovemo molekularni šaperoni. Ovi proteini preuzimaju nastali polipeptidni lanac s ribosoma i provode njegovo smatanje. Proteinski šaperoni zajedno s proteinima zaduženim za razgradnju proteina održavaju homeostazu proteina koju zovemo proteostaza⁵. Šaperoni spadaju u tzv. proteine toplinskog šoka, što znači da se ekspresija gena koji kodiraju za ove proteine poveća pri povećanju temperature, no to ne znači da ne postoji bazalna razina ekspresije tih gena pri fiziološkim uvjetima u stanici^{5,7}. Samostalno smatanje velikih proteina odvija se presporo, što uslijed interakcija između izloženih hidrofobnih dijelova više proteina može dovesti do stvaranja proteinskih agregata koji mogu biti amorfni ili fibrilarni (tzv. amiloidi), a njihovo nakupljanje može dovesti do raznih bolesti⁷. Do povećanog nastanka agregata može doći i uslijed prekomjerne ekspresije gena pojedinih proteina, pri čemu je proteinska mašinerija zadužena za smatanje zasićena proteinima te nema dovoljno vremena za smatanje svih proteina. Molekularni šaperon definira se kao bilo koji protein koji na bilo koji način pomaže drugim proteinima u smatanju, a da pritom nije prisutan u finalnoj strukturi proteina. Molekularne šaperone uglavnom dijelimo na tri sustava: šaperonini (Hsp 60), Hsp 70 i Hsp90. Svi funkcioniraju na način da prepoznaju hidrofobne bočne ogranke denaturiranih proteina te ih podvrgavaju smatanju u ciklusima koji su većinom ovisni o energiji dobivenoj hidrolizom ATP-a. *De novo* smatanje proteina spregnuto je s translacijom te se u nekih proteina odvija kotranslacijski. Ovo je puno značajnije za proteine koji se sastoje od više domena (kao što je ranije spomenuto, proteini koji se sastoje od jedne domene uglavnom se smataju posttranslacijski i neovisno o šaperonima). Važnost kotranslacijskog smatanja pridodaje se tome što šaperoni na taj način štite od agregiranja proteina jer su vezani za hidrofobne domene nesmotanih proteina^{5,7}.

Šaperoni koji su asocirani s ribosomima prvi stupaju u interakcije s novonastalim proteinom⁵. U njih ubrajamo okidački faktor (engl. *trigger factor*, TF) bakterija te kompleks asociran s ribosomom (engl. *ribosome-associated complex*, RAC) i kompleks asociran s početnim lancem (engl. *nascent-chain-associated complex*, NAC) kod eukariota. TF bakterija veže se na veliku podjedinicu ribosoma na mjestu izlaznog tunela kroz koji izlazi novosintetizirani polipeptidni lanac, gdje stupa u interakciju s većinom proteina duljih od 100 aminokiselina, neovisno o ATP-u. TF se veže za hidrofobne dijelove proteina, što sprječava već spomenuti nastanak agregata. Otpuštanje TF s novonastalog proteina ovisi o kotranslacijskoj sklonosti proteina da zakopa svoje hidrofobne dijelove. RAC i NAC eukariota imaju analognu ulogu u procesu smatanja. RAC je kompleks koji se sastoji od šaperona obitelji Hsp70 zvanog Ssz1 i košaperona obitelji Hsp40 zvanog zuotin. Njegova uloga sprežanje je translacije s kotranslacijskim smatanjem. NAC je dimer koji se sastoji od β i α podjedinice te se veže preko β podjedinice na ribosom i potpomaže smatanje manjih proteina. Uz to, pokazalo se da je NAC senzor kvalitete smatanja proteina te osigurava vjernost SRP (engl. *signal recognition particle*) čestice koja usmjerava proteine u ER⁵.

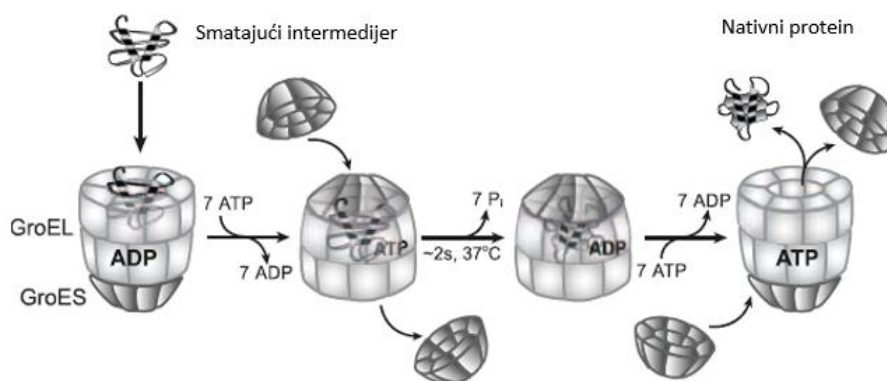
Proteini koji se ne uspiju smotati na ovaj način prenose se na sljedeći sustav smatanja, a to je Hsp70 sustav kod eukariota, odnosno DnaK/DnaJ kod bakterija^{5,7}. Za razliku od pomagača koji djeluju asocirani na ribosom, ovi šaperoni ovisni su o ATP. Protein Hsp70 (DnaK kod bakterija) sastoji se od dvije domene: N-terminalne domene za vezanje ATP-a (engl. *nucleotide binding domain*, NBD) i C-terminalne domene za vezanje supstrata (engl. *substrate binding domain*, SBD); ove dvije domene povezane su hidrofobnom poveznicom⁵. Protein Hsp70 veže se na hidrofobni dio proteina dug 5 do 7 aminokiselina. Osim u smatanju, ovi proteini sudjeluju u uklanjanju agregata, razmatanju krivo smotanih proteina i njihovom ponovnom smatanju te lokalizaciji proteina u stanici. Hsp70 regulacijski ciklus uljučuje košaperon Hsp40 (DnaJ kod bakterija) i faktore zamjene nukleotida (engl. *nucleotide exchange factors*, NEFs), odnosno njihov analog GrpE kod bakterija. Bakterije stoga imaju samo jedan DnaJ i GrpE protein, dok je kod eukariota poznato više Hsp40 i NEF, što korelira s mnogo većim

spektrum eukariotskih proteina koje treba smatati. Reakcijski ciklus ovih šaperona prikazuje Slika 3. Nesmotani protein prvo stupa u interakciju s košaperonom Hsp40, koji ga dovodi do proteina Hsp70, na koji je vezan ATP. Nastankom kompleksa Hsp70 s Hsp40 protein se prenosi na Hsp70 koji se uslijed vezanog ATP-a nalazi u tzv. otvorenoj konformaciji. Interakcija s Hsp40 potiče hidrolizu ATP-a, što kao rezultat ima okidanje konformacijske promjene Hsp70 u zatvorenu konformaciju, konformaciju koja stvara okolinu pogodnu za smatanje nesmotanog proteina. Zamjenu ADP-a ATP-om na Hsp70 obavlja protein NEF; ATP sada ponovno okida konformacijsku promjenu Hsp70 u otvorenu konformaciju te se protein otpušta. Rezultat ovog ciklusa može biti smotani ili nesmotani protein. Ukoliko je rezultat ciklusa nesmotani protein, ciklus se ponavlja ili se protein šalje u nizvodne puteve smatanja. Ukoliko se opetovanim ciklusima protein i dalje ne uspijeva smotati, sustav to prepoznaje kao defektni protein te ga usmjerava u razgradne puteve⁵.



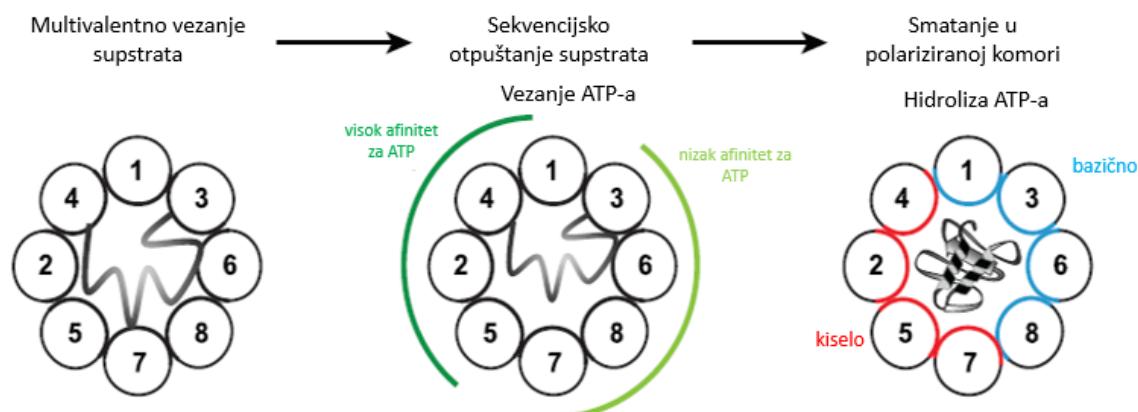
Slika 3: Reakcijski ciklus Hsp70 (preuzeto iz ⁷).

Šaperonini su cilindrični kompleksi koji zatvaraju nesmotani protein unutar svoje šupljine^{3,5,7}. Dijelev se na dvije skupine: skupina 1 djeluje u bakterijama, mitohondrijima i kloroplastima te uključuje proteine Hsp60 (GroEL) i Hsp10 (GroES) te skupina 2 kod arheja i eukariota (TRiC). Proteini koji se smataju pomoću jedne skupine ne mogu se smatati pomoću druge skupine i obratno, što ukazuje na razlike u mehanizmima između ove dvije skupine⁵. GroEL sastoji se od 14 monomera koji zajedno tvore cilindar u kojem će se protein smatati. Svaki monomer sastoji se od apikalne domene (služi za interakciju s GroES) i ekvatorijalne domene (ATP-aza), koje su međusobno povezane intermedijarnom domenom. Protein GroES sastoji se od 7 monomera. Reakcijski ciklus GroEL/GroES prikazuje Slika 4. Protein koji se treba smotati ulazi u jednu od dvije šupljine GroEL prstena. GroES zatvara tu šupljinu ovisno o zamjeni 7 molekula ADP-a na 7 monomera GroEL kompleksa ATP-om, što značajno mijenja konformaciju tog dijela GroEL. Sekvestrirani nesmotani protein smata se u vremenu potrebnom da se odvije hidroliza ATP-a na svih 7 monomera te polovice GroEL kompleksa. Vezanje 7 ATP-a na drugu stranu molekule GroEL potiče otpuštanje GroES te oslobađanje smotanog proteina iz prve šupljine. Istodobno, drugi protein sada može doći u drugu šupljinu GroEL te se mehanizam ponavlja. Ovim sustavom mogu se smatati proteini veličine do 60 kDa. Pravilno smotani protein se otpušta, a nepravilno smotani ili nesmotani protein se može podvrgnuti novom ciklusu smatanja.



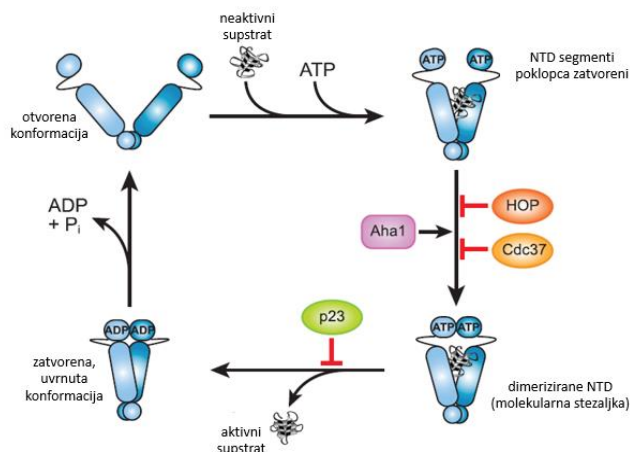
Slika 4: Mehanizam smatanja proteina GroEL/GroES sustavom (preuzeto i prilagođeno prema ⁵).

Kompleks TriC kod eukariota također funkcionira po principu otvorene i zatvorene konformacije, no postoje fundamentalne razlike s obzirom na GroEL proteinski kompleks⁵. Za razliku od GroEL, koji je po sastavu homooligomerni kompleks, svaki prsten TriC se sastoji od 8 paralognih podjedinica, svaka s različitim stupnjem prepoznavanja supstrata i s različitim afinitetom vezanja ATP-a. Zbog ovih svojstava, smatanje proteina u ovom kompleksu teče sekvencijalnim mehanizmom (Slika 5). Također, u šupljini se nalazi nejednolika raspodjela naboja (na jednoj strani pozitivno nabijeni bočni ogranci, a na drugoj strani negativno nabijeni), što utječe na usmjerenost smatanja proteina.



Slika 5: Mehanizam smatanja proteina na kompleksu TriC (preuzeto i prilagođeno prema ⁵).

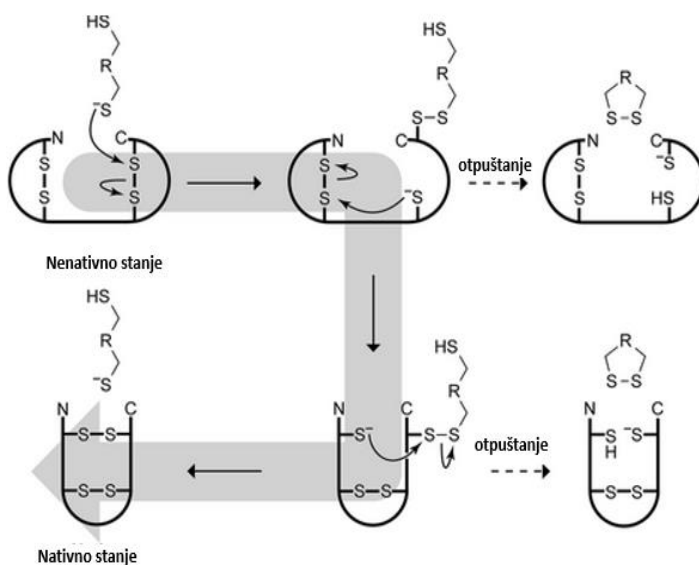
Hsp90 sustav kod eukariota pomaže smatanju te održavanju važnih signalnih peptida i proteina, kao što su transkripcijski faktori, receptori steroidnih hormona i slično^{5,7}. Hsp90 djeluje kao homodimer. Svaka od dvije podjedinice sastoji se od N-terminalne domene (NTD) koja ima ulogu u vezanju ATP-a i C-terminalne domene (CTD) povezanih nabijenom središnjom poveznicom. Konformacijski ciklus sustava Hsp90 prikazan je na Slici 6. U stanju nevezanog ATP-a Hsp90 također se nalazi u otvorenoj konformaciji; vezanjem ATP-a dolazi do povezivanja N-terminalnih domena te interakcije sa središnjom domenom okidaju konformacijsku promjenu u zatvorenu konformaciju. Središnja domena pokazuje ATP-aznu aktivnost te se hidrolizom ATP-a ponovo inducira otvorena konformacija. U ovom ciklusu sudjeluje nekoliko kofaktora. Kofaktori Hop i Cdc37 stabiliziraju otvorenu konformaciju inhibirajući hidrolizu ATP-a, što daje dovoljno vremena da se nesmotani protein veže na Hsp90. Kofaktor Aha1, na drugu stranu, stabilizira dimerizirane NTD te ubrzava hidrolizu ATP-a, a s time i okidanje konformacijske promjene. Kofaktor p23 stabilizira nastalu zatvorenu konformaciju te daje dovoljno vremena za pravilno smatanje proteina. Bakterijski ekvivalent Hsp90 zove se HtpG te, za razliku od Hsp90, smata proteine neovisno o kofaktorima.



Slika 6: Konformacijski ciklus sustava Hsp90 (preuzeto i prilagođeno prema ⁵⁾).

2.4. Stvaranje disulfidnih veza

Proteinska disulfid-izomeraza (PDI) enzim je koji katalizira nastanak disulfidnih veza pri smatanju proteina te ispravlja krivo sparene disulfidne veze nastale u ranijim fazama smatanja proteina⁸. Ovaj enzim sastoji se od dvije katalitičke A domene i dvije redoks B domene te spada u proteinsku obitelj enzima oksidoreduktaza koje u aktivnom mjestu sadrže aminokislinski motiv Cys-X-X-Cys. Katalitički mehanizam ovog enzima sastoji se od tri koraka (Slika 7). U prvom koraku N – terminalni cistein aktivnog mjesta stvara disulfidnu vezu s cisteinom supstrata, pri čemu nastaje tzv. miješani disulfid. U sljedećem koraku slobodni bočni ogranak cisteina supstrata napada na drugu disulfidnu vezu u supstratu, pri čemu se ostvaruje prva pravilna disulfidna veza. U zadnjem koraku preostali slobodni cistein napada miješani disulfid te se uspostavlja druga pravilna disulfidna veza u supstratu, uz istodobnu regeneraciju enzima. Stvaranje disulfidnih veza predstavlja dodatnu razinu pravilnog smatanja mnogih proteina. Stvaranje disulfidnih veza odvija se u kasnijim fazama smatanja proteina te je potaknuto uspostavljanjem pravilnih lokalnih domena unutar proteina, dok prerano uspostavljene disulfidne veze uglavnom budu pogrešne i onemogućuju pravilno smatanje. PDI osigurava spajanje ispravnih disulfidnih veza u proteinu s mnogo cisteinskih bočnih ograna, što je zanimljivo jer već pri malom broju cisteina u proteinu javlja se potencijal za ogromnim brojem mogućih konformacija stabiliziranih raznim parovima



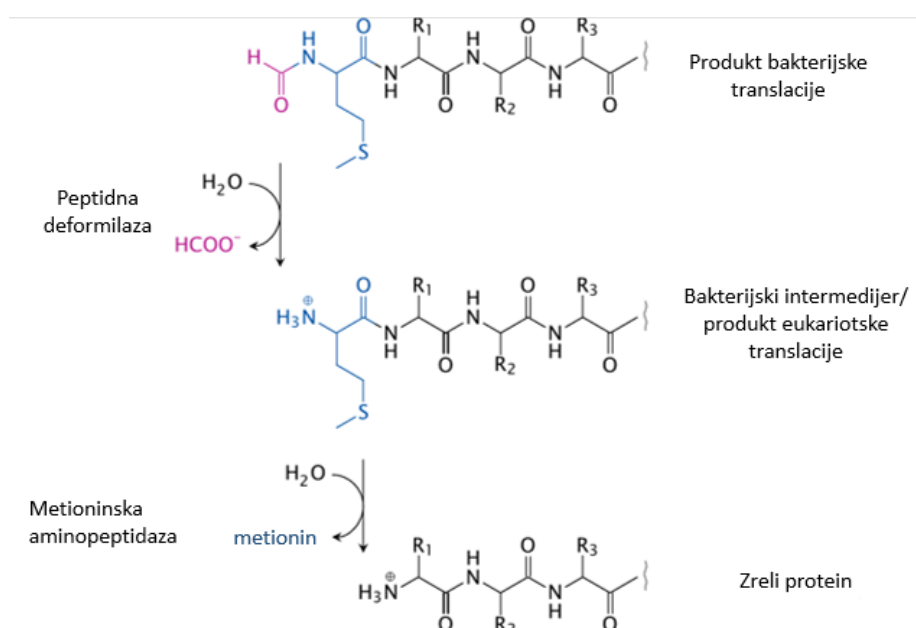
Slika 7: Katalitički mehanizam proteinske disulfid-izomeraze (preuzeto i prilagođeno prema 9).

disulfidnih veza. Smatra se da je ovo zapravo intrinzično svojstvo primarne strukture svakog zasebnog proteina te da enzim zapravo nema ulogu u uparivanju pravilnih disulfidnih veza. Dokaz koji najviše upućuje u tom smjeru činjenica je da postoji samo jedan izozim PDI koji katalizira nastanak disulfidnih veza u mnogo različitih proteina. Alternativa bi bila da svaki protein zahtjeva svoju zasebnu PDI, no specifični izozimi PDI zasad nisu otkriveni. Valja napomenuti da u smatanju proteina sudjeluje i enzim prolinska cis-trans izomeraza, koji katalizira izomerizacije prolina u proteinu koji ga sadrže.

3. PROCESIRANJE N-KRAJA

3.1. Uvod

Biosinteza svakog proteina započinje prepoznavanjem START-kodona na mRNA. AUG kodon kodira za aminokiselinu metionin. Kod prokariota te u mitohondrija i kloroplasta biosinteza proteina započinje modificiranim aminokiselinom N-formilmetionin. Ova modifikacija spječava unos N-formil metionina u unutrašnjost polipeptidnog lanca, a ujedno omogućuje smještanje aminoacilirane tRNA^{fMet} na pravilno mjesto u ribosomu koje ne prihvaća ni jednu drugu aminoacil-tRNA³. Nakon završetka biosinteze enzim deformilaza uklanja formilnu skupinu (Slika 8). Kod eukariota, svi proteini sintetizirani na citosolnim ribosomima započinju s metioninom. Međutim, pokazalo se da većina funkcionalnih proteina na N-kraju ne posjeduje metionin, već se on uklanja.



Slika 8: Shematski prikaz uklanjanja formila s metionina te metionina s N-kraja (preuzeto i prilagođeno prema ¹⁰).

3.2. Uklanjanje metionina s N-kraja

Izrezivanje N-terminalnog metionina (engl. *N-terminal methionine excision*, NME) jedna je od najučestalijih poznatih PTM¹¹. Povezuje se drugom, također učestalom PTM zvanom acetilacija, o kojoj će nešto više riječi biti u sljedećem poglavlju. Procjenjuje se da se oko dvije trećine svih poznatih proteina podvrgava ovom obliku PTM. Izrezivanje N-terminalnog metionina sveprisutna je i očuvana aktivnost svojstvena svim oblicima života. Enzimi koji obavljaju ovu PTM zovu se metioninske aminopeptidaze. Prokarioti i arheje imaju po jedan, dok su kod eukariota pronađena dva izozima metioninske aminopeptidaze. Njihova enzimska aktivnost svodi se na uklanjanje metionina u proteinima u kojima se nakon metionina nalazi jedna od sljedećih aminokiselina: Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Pro ili Val. Katalitički mehanizam metioninskih aminopeptidaza nije razjašnjen, no zna se da aktivnost metioninskih aminopeptidaza uvelike ovisi o veličini aminokiseline koja se nalazi na drugom mjestu;

uklanjanje metionina odvija se samo ako nakon metionina slijedi relativno mala aminokiselina jer očito aktivno mjesto ovog enzima ne može primiti velike aminokiseline. Ovo pravilo vrijedi za sve vrste. Prema tome sve poznate proteinske dijelimo na dvije skupine: one na koje metioninske aminopeptidaze djeluju i one na koje ne djeluju¹¹.

Gore nabrojanih sedam aminokiselina smatraju se stabilizatorima N-kraja, dok ostalih trinaest (uključujući metionin) ubrajamo u destabilizirajuće aminokiseline N-kraja pa se stoga smatra da je uklanjanje metionina neophodno kako bi se produljilo vrijeme poluživota pojedinih proteina¹¹. Naime, ova PTM povezuje se s tzv. N-krajnjim pravilom (engl. *N-end rule*, *NER*), koje pokazuje da su proteini koji uklanjanjem metionina na N-kraju steknu jednu od gore nabrojanih aminokiselina zaštićeni od preuranjene degradacije. Stoga se kao jedna od uloga ove PTM nameće potreba za produljenjem opstanka pojedinih proteina od degradacije. Ovo je dokazano supstitucijom stabilizirajuće aminokiseline nestabilizirajućom nakon uklanjanja metionina; ovom supstitucijom značajno se skratio poluživot modificiranog proteina. Druga važna uloga ove PTM omogućavanje je dodatne modifikacije stabilizirajućih aminokiselina, osobito acetilacijom. Procjenjuje se da se oko 70-80% svih eukariotskih proteina acetilira na N - terminusu, a najvećim dijelom se acetiliraju upravo Gly, Ala, Ser i Thr, četiri od sedam aminokiselina koje preferiraju metioninske aminopeptidaze. Ovo vrše enzimi N-acetiltransferaze tipa 1. Postoji i tip 2, koji acetilita metionin na N-kraju u slučaju ako se nakon metionina nalazi Asp, Asn ili Glu. Acetilacija N-kraja vrlo je slabo zastupljena u prokariota. Smatra se da važnost ove modifikacije leži u zaštiti proteina kojima se metionin ne uklanja od djelovanja metioninskih aminopeptidaza. Pokazano je da su upravo Ala i Ser odgovorni za gotovo 90% svih acetilacija proteina podvrgnutih uklanjanju metionina, što znači da je acetilacija ostalih 5 aminokiselina vrlo rijetka kod eukariota. Iz tog otkrića otvara se dodatno pitanje o specifičnosti metioninskih aminopeptidaza. Smatra se da su zapravo jedine prave mete uklanjanja metionina oni proteini koji na drugom mjestu imaju Ser ili Ala, a da su svi ostali proteini ovim enzimima supstrat isključivo jer su ostalih pet aminokiselina slične veličine i fizikalno-kemijskih svojstava kao i Ala i Ser te da metioninske aminopeptidaze nisu dovoljno specifične za uklanjanje metionina samo s tih proteina. Stoga je moguće da su ostali proteini podvrgnuti ovim enzimima samo slučajni supstrati. Očito je da postoji ogroman evolucijski pritisak za očuvanjem kodona za serin i alanin na drugom mjestu u genu jer je ovaj fenomen očuvan od bakterija do čovjeka, no razlozi ove konzerviranosti još uvijek su tema rasprave. Još jedno od potencijalnih objašnjenja zašto se metionin uklanja s ovolikog broja proteina recikliranje je metionina kako bi njegova koncentracija u stanici bila dovoljno visoka za optimalno odvijanje biosinteze proteina te za ostale uloge metionina u stanici. Naime, sinteza metionina u stanici relativno je spor proces pa je stanici u najboljem interesu ekonomično raspolaganje svim dostupnim metioninom. Doduše, ova se uloga čini manje važnom od ostalih nakon provedena eksperimenta ciljane mutageneze kojom je dobivena mutirana metioninska aminopeptidaza s manjom preferencijom prema aminokiselini na drugom mjestu u proteinu. Razina metionina u stanici, kao ni stopa biosinteze proteina, nije se značajno povećala što upućuje na to da ovo nije primarna uloga odvijanja ove PTM. Ova PTM generalno je vrlo zastupljena, osobito kod eukariota, što upućuje na to da je jedna od najvažnijih. Pretpostavlja se da je glavna uloga one PTM otvaranje mogućnosti za podvrgavanjem N-kraja ostalim PTM (osobito acetilaciji), što, kao što je objašnjeno u sljedećem poglavlju, ima cijeli spektar učinaka na stanicu i organizam u cjelosti. Doduše, glavna uloga ove PTM još uvijek nije u potpunosti razjašnjena te je tema aktivnog istraživanja¹¹.

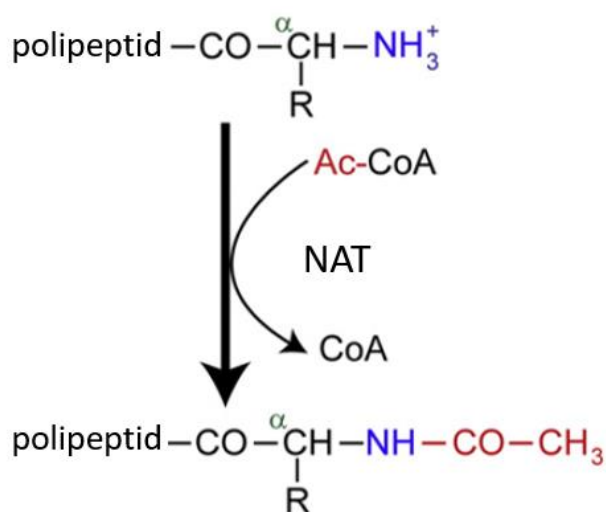
4. ACETILACIJA

4.1. Uvod u acetilaciju

Acetilacija je proces kotranslacijske ili posttranslacijske modifikacije proteina na način da se acetilna skupina donira s acetil koenzima A te se veže na protein na ili α -amino skupinu N-kraja proteina ili na ϵ -amino skupinu lizina¹². Enzimi koji provode ove PTM zovu se acetiltransferaze te se s obzirom na reakciju acetilacije koju kataliziraju dijele na N-terminalne acetiltransferaze i lizinske acetiltransferaze. Acetilom je podskup proteoma, a čini ga skup svih proteina modificiranih procesom acetilacije. Gotovo 80 – 90 % proteina kotranslacijski se acetilira na N-kraju, dok se ostali acetiliraju na N-kraju posttranslacijski. Lizinska acetilacija prvotno asocira na histone i regulaciju ekspresije gena eukariota pa su se lizinske acetiltransferaze u početku nazivale histonskim acetiltransferazama (HAT). Ipak, ovaj tip PTM nije ograničen na histone, već postoji cijeli niz proteina koje se podvrgavaju ovom procesu. Acetilacija na N-kraju smatra se ireverzibilnom, dok je acetilacija na lizinu reverzibilna i precizno regulirana putem enzima koji se zovu lizinske deacetilaze¹².

4.2. Acetilacija N-kraja

N-terminalna acetilacija proces je dodatka acetilne skupine na α -amino skupinu N-kraja proteina (Slika 9)¹². Ovo je vrlo čest proces u eukariota te se događa na većini proteina, dok se kod prokariota događa vrlo rijetko i samo na nekim poznatim primjerima proteina te nije poznat kod svih vrsta



Slika 9: N – terminalna acetilacija
(preuzeto i prilagođeno prema ¹²).

bakterija i arheja. Za razliku od eukariota, kod bakterija i arheja N-terminalna acetilacija proteina događa se posttranslacijski. Iako je acetilacija ovog tipa kod bakterija i arheja relativno rijetka, pokazalo se da je ona vrlo bitna za funkciju tih proteina. Većina acetilacije kod bakterija i arheja odvija se na proteinima stabilizatorima ribosoma. Kod eukariota se uočava trend povećanja udjela acetiloma u proteomu proporcionalno veličini genoma pa tako organizam poput *Saccharomyces cerevisiae* ima otprilike 50 – 70 % proteina acetilirano, dok kod čovjeka taj broj premašuje 90 %.

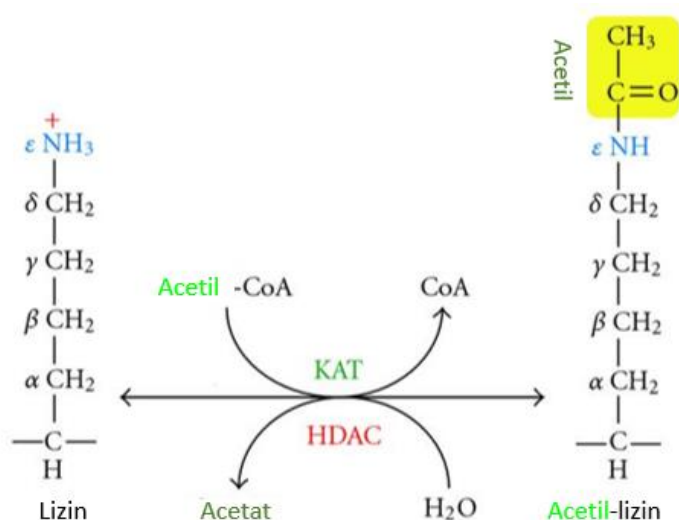
N-terminalne acetiltransferaze (NAT) prebacuju acetyl s acetyl-CoA na amino skupinu, čime nastaje amidna veza između dušika amino skupine i ugljika karboksilne skupine. Ovi enzimi zapravo kataliziraju reakciju nukleofilne adicije na blago pozitivan ugljikov atom karboksilne skupine. Nastanak ove veze sprječava odvijanje drugih modifikacija na N-kraju. NAT dodatno dijelimo na dvije skupine s obzirom na to na koju amino skupinu se prenosi acetilna skupina. Jedna skupina prenosi acetilnu skupinu na amino skupinu metionina u proteinima koji nisu supstrat enzima metioninskih aminopeptidaza. Druga skupina prenosi acetilnu skupinu na amino skupinu nakon što je protein podvrgnut djelovanju metioninske aminopaptidaze. Sve NAT su enzimi s jednom ili više domena. Jedna domena je katalitička,

a ostale su pomoćničke. Svi imaju motiv Q koji služi za vezanje acetyl-CoA. Pomoćničke podjedinice sudjeluju u vezanju na ribosom pri kontranslacijskom prebacivanju acetylne skupine. Glavni NAT kompleksi eukariota su NatA, NatB i NatC. Ovi kompleksi odgovorni su za acetylaciju 80% acetyloma u ljudskoj stanici. NatA sastoji se od katalitičke podjedinice Naa10 i pomoćničke podjedinice Naa15. Ove dvije podjedinice asocirane su s podjedinicom Naa50 koja ima intrinzičnu katalitičku aktivnost te se stoga može smatrati zasebnim enzimom i zove se NatE. NatB sastoji se od katalitičke podjedinice Naa20 i pomoćničke podjedinice Naa25. Analogno, NatC sastoji se od katalitičke Naa30 i pomoćničkih Naa35 i Naa38 podjedinica. NatD, NatE i NatF sastoje se samo od katalitičke podjedinice. Svi ovi enzimi kataliziraju istu reakciju, no razlikuju se po lokalizaciji u stanici. NatF se nalazi u Golgijevom kompleksu, a ostali u citosolu. Pojedine NAT također se razlikuju po specifičnosti. Pojedine modificiraju samo određene aminokiseline N-kraja mnogih proteina, neke acetyliraju neuklonjeni metionin, dok neke acetyliraju N-kraj uskog spektra proteina.

Uloge ove PTM zaista su mnogobrojne. N-terminalna acetylacija sudjeluje u unutarstaničnoj lokalizaciji nekih proteina. Primjer je Arl3 protein koji sudjeluje u mnogo staničnih i fizioloških procesa. Ovaj protein ne može ući u interakciju s Golgijevim kompleksom ukoliko mu nedostaje N-terminalni acetyl. Na drugu stranu, acetylacijom se pojedini proteini zadržavaju u citosolu te se inhibira njihovo usmjerenje u sekrecijske puteve. Acetylacija također sprječava druge PTM na N-terminusu te omogućuje određene protein-protein interakcije (primjeri su povećanje afiniteta proteina E2 prema proteinu E3 u procesu ubikvitinacije i stvaranje kompleksa aktina s tropomiozinom u regulaciji kontrakcije mišića). Pokazalo se da ovaj tip acetylacije ima ulogu i u olakšavanju smatanja proteina na način da stabilizira N-kraj. Ovo je dokazano u mutantima kvasca s delecijom *natA* gena; u njima je višestruko povećana ekspresija gena koji kodiraju za šaperonske sustave. Zasad kontroverzna uloga je potpomaganje održavanja stabilnosti proteina. Rezultati pojedinih istraživanja ne daju jasne rezultate povećava li acetylacija ili smanjuje stabilnost proteina. Pojedine NAT imaju ulogu u embrionalnom razvoju i regulaciji krvnog tlaka. Još jedna važna uloga N-terminalne acetylacije regulacija je lokalizacije proteasoma, kompleksa za razgradnju proteina. Proteasom je lokaliziran u jezgri, citoplazmi i granulama koje skladište proteasom. Precizna lokalizacija proteasoma, kao i njegova sekvencijacija u granule rezultat su selektivne N-acetylacije. NatC izozim ima u ovom procesu ulogu ukoncentriravanja proteasoma u jezgri, dok NatB izozim potiče stvaranje granula s proteasomom. Ovaj proces povezuje se sa starenjem stanice te povećanom proteolizom uslijed starenja. NatA izozim također je povezan sa selektivnom mitolizom (razgradnjom mitohondrija) na način da N-acetylira površinski receptor Atg32, čime se mitohondrij usmjerava na razgradnju. Postoji još ogroman broj uloga N-acetylacije, kao što su regulacija rada ribosoma, slaganje viriona pojedinih vrsta virusa, održavanje integriteta Golgijevog kompleksa, razdiobi kromosoma u staničnoj diobi, stabilizaciji nekih hormona te modifikaciji N-kraja proteina modificiranih proteolizom (ti proteini mogu imati nekoliko N-krajeva), a sve više se istražuje uloga acetylacije u neurodegenerativnim bolestima, kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest te pri tumorigenezi (mutirana NatA pokazala se kao modifikator proteina koji sudjeluju u signalnim putevima ključnim za okidanje karcinogeneze te poremećaju staničnog ciklusa). Zbog brojnih uloga te primjena u medicini i molekularnoj biologiji ova je PTM zadnjih godina postala jedno od glavnih područja istraživanja jer će bolji uvid u njezinu ulogu dati potencijalno brojne odgovore na pitanja kako suzbiti teške neurodegenerativne i maligne bolesti¹².

4.3. Acetilacija lizina

Acetilacija lizina na ϵ -amino skupini u početku se smatrala kao PTM ograničena na histone i popratno regulaciju ekspresije gena kod eukariotskih organizama, no kasnijim istraživanjima pokazalo se da je ova PTM, uz fosforilaciju, najbrojnija te ima ogroman utjecaj na staničnu signalizaciju i metabolizam¹². Kao i N-terminalna acetilacija, acetilacija lizina ovisna je o acetyl-CoA (Slika 10). U ovom procesu sudjeluju enzimi zvani lizinske acetyltransferaze (KAT), lizinske deacetylaze (KDAC) te proteini koji prepoznaju i vežu proteine s modificiranim lizinom; ove proteine karakterizira strukturni motiv

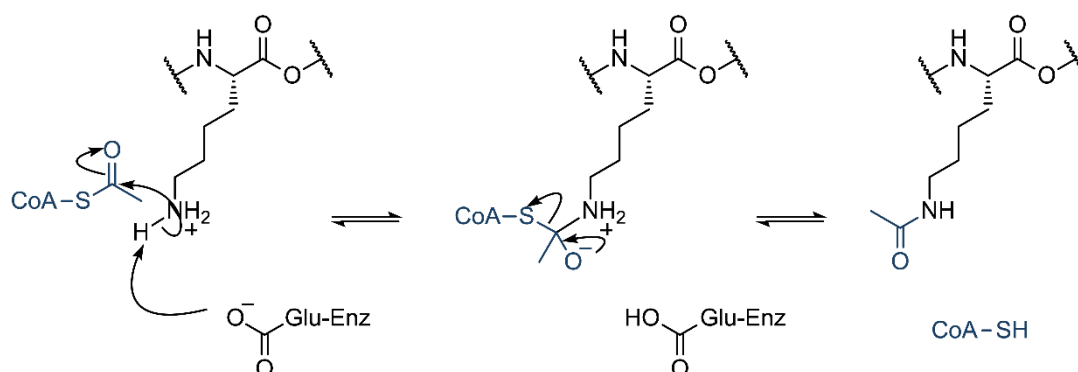


zvan bromodomena kojim prepoznaju acetylirani lizin. Transkripcijski faktori dobar su primjer ovih proteina. Za razliku od N-acetilacije, acetilacija lizina reverzibilan je proces, slično kao fosforilacija, što je iznimno važno jer obje PTM imaju značajnu ulogu u regulaciji pojedinih metaboličkih i signalnih puteva. Osim acetilacije putem KAT, uočeno je i spontano, neenzimsko acetyliranje proteina izravnom interakcijom s acetyl-CoA u uvjetima visoke pH vrijednosti i visoke koncentracije Ac-CoA, uvjetima kakvi vladaju u mitohondriju. Acetilacija lizina poprilično je konzerviran proces.

Slika 10: Acetilacija lizina (preuzeto i prilagođeno prema¹³).

Udio acetyliranih lizina povećava se proporcionalno veličini genoma, analogno N-acetilaciji. Za razliku od N-acetilacije, lizinska acetilacija odvija se znatno češće u bakterija te je u njih predominantna PTM s obzirom na fosforilaciju, a samim time mnogo je češća u mitohondrijima i kloroplastima. Zanimljiva činjenica je to da je acetilacija češće zamijećena u visoko organiziranim dijelovima proteina (zavojnice, nabrane ploče), za razliku od fosforilacije, koja se češće odvija u fleksibilnim regijama proteina.

Lizinske su se acetyltransferaze u početku nazivale histonskim acetyltransferazama (HAT) kao rezultat nepoznavanja modifikacija lizina izvan okvira modifikacije histona. Lizinske acetyltransferaze svrstane su u tri glavne obitelji: GNAT, MYST i CPB. Njihov broj u ljudskim stanicama znatno je veći od broja NAT. Većina svoju funkciju obavlja kao multiproteinski enzimi, koji sadrže katalitičku podjedinicu i podjedinice o kojima ovisi specifičnost pojedinog enzima. Pojedine domene odgovorne su za specifičnu sublokalizaciju pojedinih KAT. Od ključne je važnosti podjedinica s domenom takozvanih PHD prstiju, odgovorna za vezanje neacetyliranog lizina. Katalitički mehanizam ovih enzima prikazuje Slika 11.



Slika 11: Katalitički mehanizam lizinskih acetyltransferaza na primjeru karnitinske KAT (preuzeto iz¹⁴).

U prvom koraku bočni ogranak Glu aktivnog mjesta enzima djeluje kao baza i uzima proton s amino skupine lizina. Amino skupina bočnog ogranka lizina sada djeluje kao nukleofil te napada karboksilni ugljikov atom molekule acetyl-CoA, čime se ostvaruje amidna veza između dušikovog atoma amino skupine lizina i karboksilnog ugljikovog atoma acetata. U zadnjem koraku već spomenuti bočni ogranak Glu sada djeluje kao kiselina te donira proton tiolnoj skupini Co-A, što ujedno regenerira ovaj enzim.

Osim histona, acetilaciji su podvrgnuti transkripcijski faktori, npr. TFIIB i TFIIIE te mnogi proteini signalnih puteva, kao što su p53 i β -katenin. Zanimljiv je podatak da su RNA molekule, posebice tRNA također podvrgnuti acetilaciji, kao dio njihove posttranskripcijske modifikacije, posredstvom proteina Elp3. Iz tog razloga ova PTM ima značajnu ulogu u (epi)genetičkoj regulaciji ekspresije gena. Osim proteina lokaliziranih u jezgri, postoji cijeli spektar citosolnih proteina podvrgnutih acetilaciji lizina. Acetiliraju se lizini proteina odgovornih za pravilnu citokinezu u telofazi te proteini koji su sastavni dio puteva koji reguliraju rast i diferencijaciju stanice, kao što su TGF- β , p53, Notch i Rb; nemogućnost pravilne acetilacije ovih proteina sve se više povezuje s transformacijama stanice i onkogenezom. Vrlo je zanimljiva činjenica da su same lizinske acetyltransferaze podvrgnute acetilaciji, što zovemo autoacetilacija. Primjer je p300 KAT koja se autoacetilira na pet lizina lociranih na C-kraju. Autoacetilacija okida konformacijsku promjenu, što značajno povećava katalitičku aktivnost ovih enzima na način da promjena konformacije omogućuje lakše vezanje supstrata. Ovo predstavlja dodatnu razinu regulacije cjelokupnog procesa acetilacije lizina.

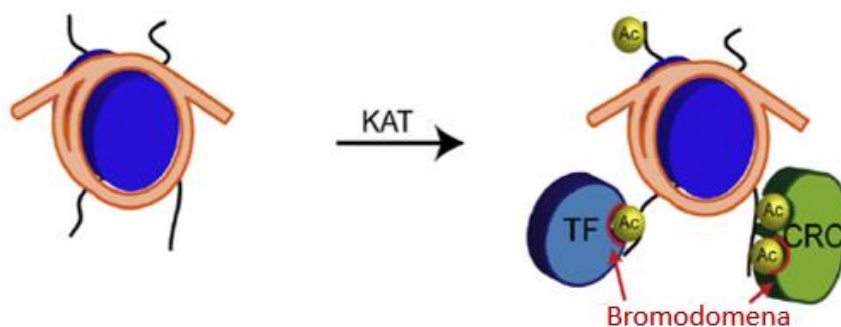
Lizinske deacetylaze (KDAC) također su prvotno bile poznate kao histonske deacetylaze (HDAC), a neke su i danas zadržale to ime. Zajedno s acetyltransferazama održavaju homeostazu acetyloma. Dijelev se u 4 skupine. Skupine I, II i IV su metalne amidohidrolaze ovisne o kofaktoru Zn^{2+} , dok se skupina 3 još naziva sirtuini te su ovisni o kofaktoru NAD^+ kao kosupstratu za katalitičku aktivnost. HDAC ovisne o cinku lokalizirane su uglavnom u jezgri i citoplazmi, dok su sirtuini dodatno lokalizirani i u mitohondrijima. Supstrati skupina I i II većinom su histoni i transkripcijski faktori te se ove dvije skupine generalno nalaze asociirane u komplekse s transkripcijskim represorima u jezgri. Osim toga, klasa II prisutna je i u citoplazmi te regulira aktivnost proteina, a primjer je ranije spomenuti Hsp90. Skupina IV sadrži samo jedan član, HDAC11 te je jedina poznata uloga ovog proteina regulacija ekspresije gena za interleukin 10 u antigen predodnim stanicama te je stoga njegova jedina poznata fiziološka uloga odlučivanje između specifične imunoreakcije i imunološke tolerancije. Sirtuini su lokalizirani posvuda po stanici, gdje obavljaju razne uloge. Najveća posebnost je to što se nalaze u mitohondriju, gdje reguliraju brojne metaboličke procese¹².

4.4. Histoni i uloga acetilacije u regulaciji ekspresije gena eukariota

Kao što je već ranije napomenuto, histoni su prvi otkriveni proteini podvrgnuti acetilaciji¹². Sva četiri tipa histona acetiliraju se pomoću raznih „histonskih“ acetyltransferaza. Po dva monomera svakog histona tvore nukleosom koji oko sebe omata 146 pb DNA u jezgri eukariota. Pojedini nukleosomi povezani su DNA-poveznicom duljine 50 pb. Vrlo važna karakteristika histonskih proteina je da su to proteini iznimno bogati bazičnim aminokiselinama, osobito lizinom, što je od presudne važnosti za njihovu ulogu iz dva razloga: pozitivni bočni ogranci lizina asociiraju s negativno nabijenom šećerno-fosfatnom okosnicom DNA, što omogućuje omatanje DNA te su ti lizini svi potencijalni supstrati za djelovanje lizinskih acetyltransferaza. Acetilacija nije jedina PTM koja se odvija na histonima; oni su također podvrgnuti metilaciji i fosforilaciji. Višim razinama pakiranja DNA s histonima (nukleosom \rightarrow kromatidno vlakno \rightarrow rozeta \rightarrow zavoj kromatide \rightarrow kromatida) stvara se kromatin koji može biti transkripcijski aktivan ili inaktivan³. Prije prelaska na objašnjenje uloge acetilacije u regulaciji ekspresije gena nužno je objasniti pojmove permisivni i nepermisivni uvjeti³. Permisivni uvjeti opisuju stanje genoma u kojem je DNA generalno dostupna transkripcijskoj mašineriji te se regulacija ekspresije gena

odvija dominantno preko negativne regulacije, odnosno putem represorskih proteina. Ovo je generalno karakteristično za genome prokariota, koji nemaju mnogo gena. Nepermisivni uvjeti opisuju stanje genoma u kojem je DNA u kromatinu strukturirana na način da je transkripcijskoj mašineriji onemogućen pristup te se ovaj pojam povezuje s pojmom pozitivne regulacije kod eukariota. Velika razlika u ekspresiji gena razlikuje se između prokariota i eukariota iz dva razloga: geni prokariota uvelike su grupirani u operone te je jedan represor dovoljan za utišavanje cjelokupnog operona (primjer je *trp* operon, kod kojeg se *trp* represor veže na operatorsko mjesto te onemogućuje transkripciju cjelokupnog operona), dok se geni gotovo svih eukariota ne nalaze u operonima te se prepisuju zasebno, putem monocistronske mRNA. Imajući na umu da genomi pojedinih eukariota imaju više desetaka tisuća gena, kada bi se svaki gen regulirao zasebnim proteinskim represorom, veličina genoma svakog pojedinog eukariota morala bi se najmanje udvostručiti. Stoga je eukariotski genom podvrgnut tzv. globalnoj regulaciji, u kojoj struktura kromatina simultano utišava ekspresiju svih gena³.

Histoni se acetiliraju odmah nakon sinteze, što usmjerava njihov odlazak u jezgru¹². Acetilacija lizina na položajima 5 i 12 (K5, K12) histona H4, što ga usmjerava u jezgru, očuvana je u svih vrsta, dok je položaj acetilacije histona H3, koja ga usmjerava u jezgru, nešto slabije očuvan te ovisi o vrsti organizma. Navedene acetilacije potiču djelovanje šaperona koji će olakšati sklapanje nukleosoma. Nakon udruživanje s DNA, ovaj obrazac acetilacije histona se gubi. Acetilacija histona u drugačijem obrascu aktivira ekspresiju gena. Visok stupanj acetilacije povezuje se s povećanom ekspresijom gena i transkripcijskom aktivnosti. Acetilacija histona ima destabilizirajući učinak na strukturu nukleosoma. Naime, acetilacijom se neutralizira pozitivno nabijeni bočni ogranak lizina te se tako neutraliziraju elektrostatske interakcije između histona i okosnice DNA, presudne za stabilizaciju nukleosoma. Rezultat acetilacije histona prijelaz je kromatina iz gusto pakiranog heterokromatina u slabo pakirani eukromatin. Veća dostupnost DNA kao rezultat nastanka eukromatina rezultira većom ekspresijom gena. Osim interakcija između DNA i histona, acetilacija ima i učinak na protein-protein interakcije između samih histona u nukleosomu, posebice na dimerizaciju histona H2A i H2B, što oslabi interakcije u cijelom nukleosomskom oktameru. Postoji i treća uloga acetilacije histona. Ranije je spomenuto da postoji skup proteina okarakteriziranih strukturnom bromodomenom koji prepoznaju i vežu acetilirane proteine. To su mahom transkripcijski faktori (TF) i kompleksi za remodeliranje kromatina (CRC) koji prepoznaju acetilirane histonske repove (Slika 12).



Slika 12: Acetilirane histonske repove prepoznaju TF i CRC (preuzeto i prilagođeno prema¹⁰).

Histonske deacetilaze u ovom procesu djeluju antagonistički, odnosno potiču represiju transkripcije. Njihov učinak je hipoacetilacija histona, čime se vežu enzimi koji sadrže tzv. SANT domenu. Ovi enzimi imaju veći afinitet vezanja za neacetilirane histonske repove. Oni se nalaze u velikom proteinskom kompleksu HDAC3 koji ima ulogu u vezanju korepresora na specifična mjesta u genomu te generalno reprimiraju ekspresiju gena. Generalno, sustav HAT-HDAC predstavlja važnu sastavnicu regulacije ekspresije gena kod eukariota te regulacija njihove aktivnosti određuje razinu ekspresije mnogih gena eukariotske stanice¹².

4.5. Primjeri drugih posljedica acetilacije proteina na bočnom ogranku lizina

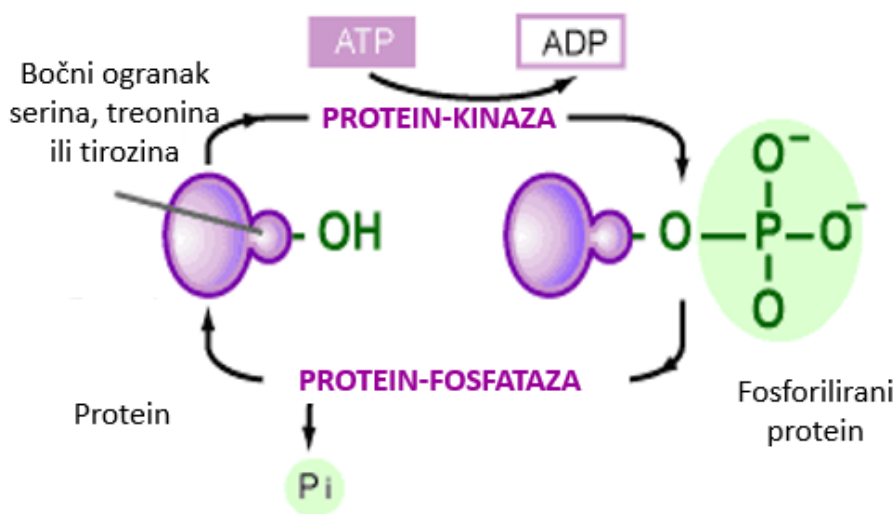
Proteini citoskeleta važan su supstrat lizinskih acetiltransferaza¹². Citoskelet se sastoji od mikrotubula, mikrofilamenata i intermedijarnih filamenata. Mikrofilamente gradi protein aktin. Aktin je globularni monomerni protein te ga u tom obliku zovemo G-aktin; on posjeduje mogućnost polimerizacije, čime nastaje protein F-aktin. Zasad su poznate tri izoforme G aktina (α , β i γ) te se sva tri mogu acetilirati, no najvažnija je acetilacija γ izoforme, koja omogućuje veću stabilnost filamenata F-aktina. Osim aktina, pokazalo se da se acetilacija vrši i na proteinu zvanom kortaktin, proteinu koji se veže za F-aktin te olakšava njegovu polimerizaciju i grananje. Kortaktin ovu ulogu izvršava sve dok je nemodificiran; acetilacijom na devet lizina gubi se njegov afinitet prema aktinu, što inhibira vezanje na aktin. Ovo je reverzibilna reakcija koju poništavaju deacetilaze SIRT1 ili HDAC6. Mikrotubuli su također važni citoskeletni proteini, koje grade ponavljajući motiv heterodimera koji se sastoji od α -tubulina i β -tubulina. α -tubulin podložan je acetilaciji i deacetilaciji na položaju lizina na četrdesetoj poziciji. β -tubulin također je podložan acetilaciji, što potiče polimerizaciju mikrotubula, no pokazalo se da ne utječe na konformaciju samih dimera, već da acetilacija utječe na lokalizaciju mikrotubula te asocijaciju drugih proteina na njih. Mnogo je drugih primjera acetiliranih proteina, kao što su receptori estrogena, HMG proteini te p53 (prvi identificirani nehistski supstrat lizinskih acetiltransferaza). Protein p53 jedan je od glavnih tumor supresora te je podložan i mnogim drugim PTM, no čini se da je acetilacija najvažnija jer ga aktivira (tri lizina potrebno je acetilirati kako bi se ovaj protein aktivirao). Inaktivni p53 u interakciji je s proteinom Mdm2, što protein p53 usmjerava na razgradnju. Ako se protein p53 acetilira na dvije pozicije (K120, K164), p53 raskida interakciju s proteinom Mdm2, što rezultira povećanom ekspresijom gena reguliranih proteinom p53 te dolazi do inhibicije rasta potencijalne transformirane stanice posredstvom proteina p21, koji je također u interakciji s proteinom p53 dok se ne acetiliraju spomenuta dva lizina na proteinu p53. Acetilacijom trećeg lizina na proteinu p53, lociranog nedaleko C-kraja, potiče se ekspresija apoptotičkih gena te dolazi do lize stanice. Na drugu stranu, ako dođe do deacetilacije acetiliranih lizina na proteinu p53, dolazi do represije transkripcije gena kontroliranih ovim proteinom te stanica preživljava. Ovo su samo pojedini izabrani primjeri te se otkriva sve više i više proteina reguliranih upravo ovom PTM.

Osim staničnih, acetilacija proteina na lizinu ima i brojne fiziološke uloge. Neke od njih su signalizacija, promet proteinima, regulacija općeg metabolizma, apoptoza te reakcija na stres. Acetilacijom se troši acetyl-CoA, što utječe na aktivnost gotovo svih metaboličkih puteva iz razloga što je acetyl-CoA centralni metabolit prema kojemu konvergira većina kataboličkih puteva te iz kojeg divergira većina anaboličkih puteva. Proizvodnja acetyl-CoA inhibirana je negativnom povratnom spregom upravo na način da se enzimi koji sudjeluju u kataboličkim reakcijama inhibiraju acetilacijom, što signalizira dovoljnu koncentraciju acetyl-CoA u stanici. Stoga je spektar acetiloma u mitohondriju spregnut s energetske statusom stanice budući da se velika većina energije stvara upravo iz visokoenergetskih elektrona koji se dobivaju oksidacijom acetyl-CoA. Procesi acetilacije i deacetilacije djeluju na pH vrijednost na način da se ravnotežom između procesa acetilacije i deacetilacije u konačnici oslobađa mnogo acetata i pH vrijednost se smanjuje. Sprječavanje prevelikog pada pH vrijednosti omogućeno je postojanjem tzv. monokarboksilatnog transportera koji izbacuje acetatne ione iz stanice u simportu s H^+ ionima. Također, ciljna mjesta acetilacije mogu se različito ponašati s promjenom pH vrijednosti. Budući da postoji vrlo precizna ravnoteža između acetilacije i deacetilacije, već blagi poremećaji te ravnoteže dovode do mnogih bolesti. Acetilacija je povezana s brojnim neurodegenerativnim bolestima, poremećajima u razvoju te brojnim drugim bolestima, kao što su diabetes, tumorigeneza, autoimune bolesti, astma, podložnost retrovirusnim infekcijama i mnoge druge¹².

5. FOSFORILACIJA

5.1. Uvod

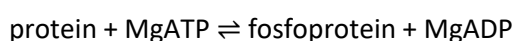
Fosforilacija je najpoznatija i najraširenija PTM, a predstavlja prijenos fosforilne skupine na bočne ogranke pojedinih aminokiselina u ciljnom proteinu (Slika 13)¹⁵. Ova PTM predstavlja glavni regulacijski mehanizam reverzibilne modifikacije proteina. Enzimi koji provode fosforilaciju zovu se proteinske kinaze, a proteini koji uklanjaju fosfatne skupine s fosforiliranih proteina zovu se proteinske fosfataze. Pokusima s radioaktivnim P_i pokazalo se da je oko dvije trećine svih ljudskih proteina podložno fosforilaciji, a zapravo se smatra da je ovaj broj i puno veći. Aminokiseline koje su podložne fosforilaciji zovemo fosfoaminokiseline. Glavne fosfoaminokiseline na kojima se fosforilacija odvija su bočni ogranci serina, treonina i tirozina. Ovaj tip zovemo O-fosforilacija. Fosforilacija serina nadaleko predominira, dok je fosforilacija treonina nešto rjeđa. Fosforilacija na tirozinu poprilično je rijetka te se uglavnom odvija na pojedinim signalnim receptorima koji imaju vlastitu tirozin-kinaznu aktivnost, poput receptora za inzulin. Osim ovih, poznati su primjeri fosforilacije proteina na histidinu i aspartatu. Ovaj tip zovemo N-fosforilacija, no vrlo se rijetko odvija iz razloga što su ove aminokiseline u fosforiliranom obliku nestabilne. Fosforilacija je preduvjet okidanja konformacijskih promjena u proteinu iz razloga što prevodi pojedine bočne ogranke iz nenabijenih polarnih u negativno nabijene, što ima značajan utjecaj na konformaciju pojedinog proteina¹⁵.



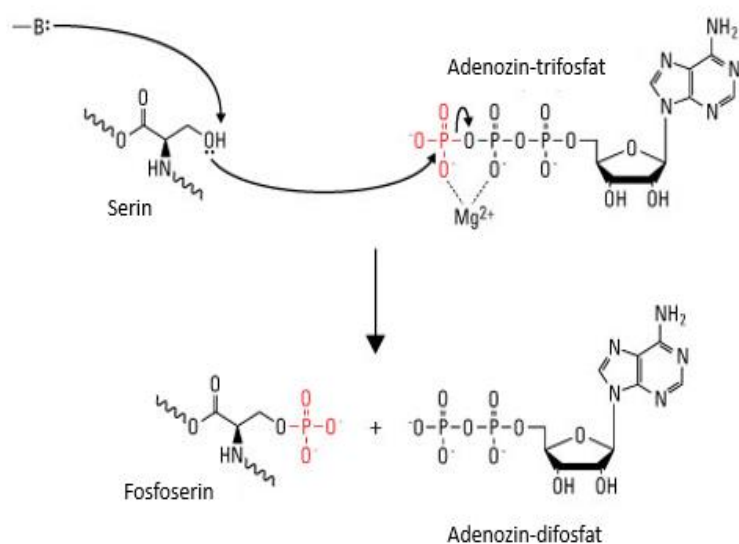
Slika 13: Shematski prikaz fosforilacije i defosforilacije proteina (preuzeto i prilagođeno prema¹⁶).

5.2. Kinaze i fosfataze

Proteinske kinaze su enzimi koji prenose fosforilnu skupinu s ATP-a na ciljni protein¹⁵. Supstrati ovih enzima stoga su protein koji se modificira te ATP u obliku MgATP. Važnost ovih enzima lako je uvidjeti već iz njihovog broja. Samo kod čovjeka zasad je identificirano 518 različitih proteinskih kinaza. Svaka od ovih kinaza ima zasebne supstrate ili skupine supstrata koje fosforiliraju, no sve kinaze imaju pojedine očuvane karakteristike. Primjerice, svim kinazama zajednički je jedan supstrat, a to je ATP. Osim toga, sve kinaze dijele slične strukturne karakteristike i sličan katalitički mehanizam. Kemijska reakcija koju kataliziraju kinaze glasi:



U pojedinim slučajevima supstrat kinaze može biti slobodan ATP, no koncentracija slobodnog ATP-a u stanici vrlo je mala iz razloga što magnezijevi ioni imaju vrlo velik afinitet prema ATP-u. Stoga kinaze možemo interpretirati kao metaloenzime kojima je magnezij (te u nekim primjerima mangan) potreban za katalizu. Postoji velika raznolikost među kinazama s obzirom na to kako teče katalitički mehanizam. Pojedine kinaze prvo vežu MgATP, a zatim protein, neke prvo vežu protein, a zatim MgATP, dok neke istovremeno vežu oba supstrata. Pojedine kinaze kataliziraju izravnu reakciju između supstrata, dok pojedine uključuju nastanak kovalentnog enzimskog intermedijera¹⁵.



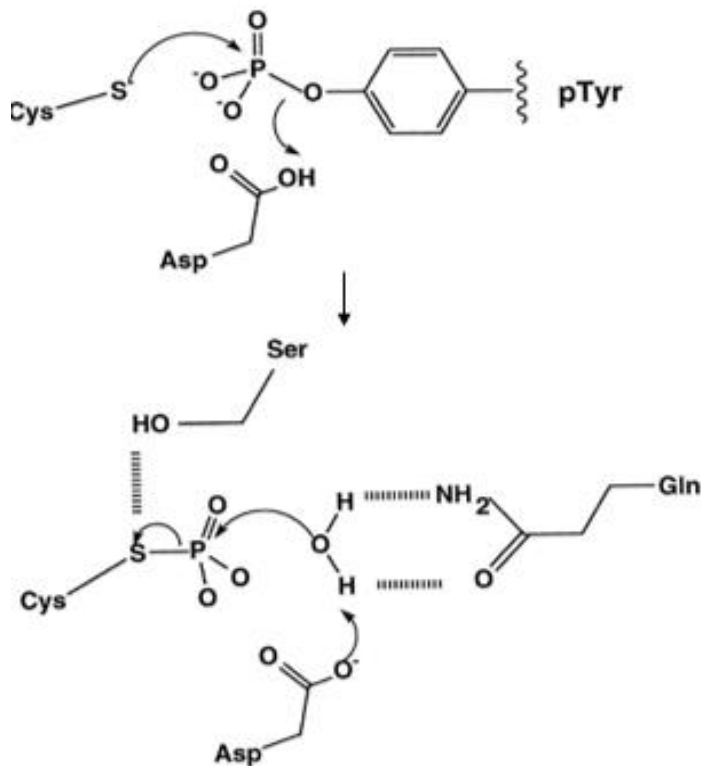
Slika 14: Katalitički mehanizam proteinskih kinaza

(preuzeto i prilagođeno prema¹⁷).

Slika 14 prikazuje generalni mehanizam djelovanja ovih enzima. U prvom koraku bočni ogranak aminokiseline (npr. Glu) djeluje kao baza te uzima proton bočnom ogranku serina ciljnog proteina. Time kisik serina postaje jači nukleofil te napada γ -fosfor u ATP-u, pri čemu nastaje veza između kisikovog atoma serina te fosfora u ortofosfatu. Ranije spomenuta aminokiselina u aktivnom mjestu sada djeluje kao kiselina te donira proton kisikovom atomu na β - fosforovom atomu, čime se izvršila regeneracija enzima.

Zanimljiva činjenica je to da su same kinaze regulirane fosforilacijom, bilo putem autofosforilacije ili putem drugih kinaza¹⁵. Katalitička domena kinaza sastoji se od dvije poddomene (N i C), povezane peptidnom poveznicom koja ujedno i oblikuje aktivno mjesto kinaza. Katalitička domena u aktivnim kinazama nedostupna je zbog rotacije N i C poddomena. Aktivacija katalitičke domene vrši se putem fosforilacije tzv. aktivacijske petlje. Osim katalitičke domene, kinaze se sastoje i od nekatalitičkih domena, koje imaju ulogu vezanja supstrata i interakcije s drugim (signalnim) proteinima. Kinaze se generalno klasificiraju s obzirom na aminokiselinu na koju djeluju. Mnoge kinaze djeluju i na serin i na treonin pa ih se stoga klasificira kao STK (serinske/treoninske kinaze). Tirozinske kinaze fosforiliraju tirozin. Pojedine kinaze djeluju na sve tri aminokiseline pa se klasificiraju kao kinaze dualne specifičnosti, DSK. Ove kinaze su uglavnom odgovorne za fosforilaciju drugih kinaza¹⁵.

Fosfataze su enzimi koji imaju ulogu antagonističku kinazama¹⁵. Njihova uloga stoga je uklanjanje fosfatnih skupina s fosfoaminokiselina hidrolizom fosfoestera nastalih djelovanjem kinaza. Djelovanje kinaza i fosfataza održava homeostazu fosforilacije proteina, što regulira mnoge metaboličke i signalne procese u stanici, o čemu će riječi biti u sljedećim odjeljcima. Proteinske fosfataze klasificiraju se u tri skupine: fosfoprotein-fosfataze (PPP), proteinske metalofosfataze (PPM) i proteinske tirozin-fosfataze (PTP, ovisne o cisteinu). Katalitički mehanizam proteinskih tirozin-fosfataza prikazuje Slika 15. Za razliku od kinaza, koje prenose fosforilnu skupinu s ATP-a na protein, defosforilacija ne vraća fosforilnu skupinu na ADP, već ju oslobađa kao slobodni fosfatni ion iz razloga što bi za fosforilaciju ADP-a bio potreban utrošak energije. PTP defosforiliraju, osim proteina, i ugljikohidrate, mRNA i fosfoinozotide¹⁵.



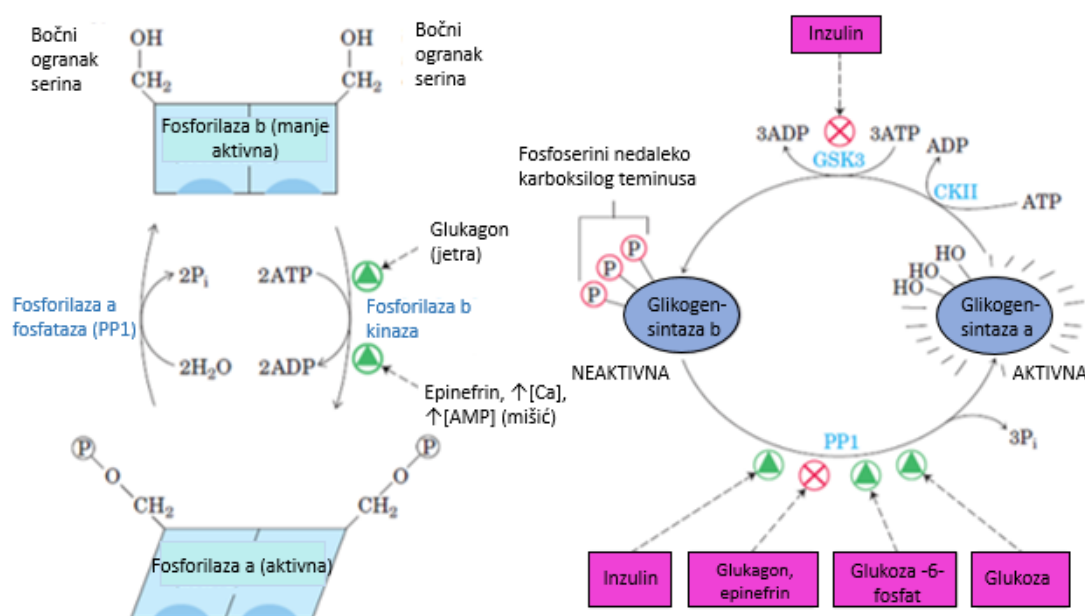
Tirozinska fosfataza u aktivnom mjestu sadrži cistein ključan u katalitičkom mehanizmu ovih enzima. Tiolna skupina cisteina u prvom koraku nukleofilno napada fosforov atom vezan na tirozin, pri čemu nastaje fosfocisteinski intermedijer. Istovremeno, aspartat u aktivnom mjestu djeluje kao kiselina te protonira kisikov atom tirozina. U drugom koraku deprotonirani aspartat i glutamin u aktivnom mjestu pozicioniraju molekulu vode za nukleofilni napad na fosfocisteinski intermedijer. Kisikov atom vode nukleofilno napada fosforov atom, čime se fosfat otpušta i ujedno se regenerira enzim.

Slika 15: Katalitički mehanizam tirozinske fosfataze (preuzeto iz¹⁸).

5.3. Metabolički i signalni putevi predominantno su regulirani fosforilacijom

Glikogen je makromolekula koja se sastoji od polimeriziranih molekula glukoze te je analog škroba, što znači da ima ulogu skladištenja glukoze u organizmu³. Glikogen se skladišti u jetri i mišićima u obliku granula koje također sadrže enzime za njegovu sintezu i razgradnju. Regulacija metabolizma glikogena temelji se na (de)fosforilaciji odgovornih enzima. U slučaju viška glukoze u organizmu, odnosno u stanju energetske bogatstva, glukoza se u obliku šećernog nukleotida (UDP-glukoza) polimerizira u glikogen posredstvom enzima glikogen-sintaza. U nedostatku glukoze u organizmu enzim glikogen-fosforilaza mobilizira glikogen na način da odgrađuje molekule glukoze s nereducirajućeg kraja glikogena. Glikogen-fosforilaza skeletnog mišića postoji u dva oblika: glikogen-fosforilaza a koja je katalitički aktivni enzim te glikogen-fosforilaza b, katalitički znatno manje aktivan enzim. Razlika između ova dva oblika glikogen-fosforilaze uzrokovana je fosforilacijom jednog, odnosno defosforilacijom drugog oblika ovog enzima, što kao rezultat ima značajnu konformacijsku promjenu, a samim time i značajnu promjenu u aktivnosti (Slika 16). Glikogen-fosforilaza a fosforilirana je na serinu na četrnaestom položaju na obje podjedinice, što za ulogu ima povećanje katalitičke aktivnosti u slučaju povećane potrebe za glukozom, kao što je gladovanje ili stresne situacije. Enzim koji vrši fosforilaciju zove se kinaza fosforilaze b. Ova kinaza regulirana je hormonima kao što su glukagon ili adrenalin, koji pokreću signalne kaskade koje također koriste fosforilaciju pojedinih enzima za prijenos signala. Stoga se regulacija razine glukoze u organizmu regulira precizno signaliziranom fosforilacijom enzima koji će razgrađivati glikogen. Kada se zadovolje energetske potrebe organizma, enzim fosfoprotein-fosfataza 1 (PP1) defosforilira glikogen-fosforilazu a te nastaje manje aktivan oblik. Enzim koji sintetizira glikogen zovemo glikogen-sintaza te je njegova aktivnost također regulirana fosforilacijom. Ovaj enzim također postoji u dvije izoforme: oblik a koji je više aktivan i b oblik koji je inaktivan. U ovom slučaju fosforilacija okida konformacijsku promjenu koja će inhibirati aktivnost ovog enzima. Stoga je a oblik defosforiliran,

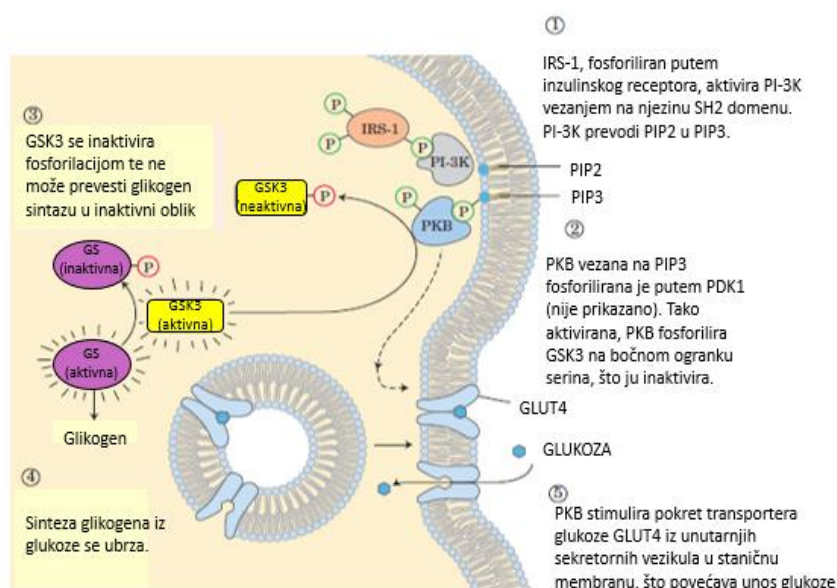
a njegovom fosforilacijom nastaje manje aktivan b oblik. Enzim koji katalizira fosforilaciju glikogen-sintaze a zove se glikogen-sintaza-3-kinaza (GSK3). Ova kinaza ne može fosforilirati glikogen-sintazu a dok ju prvo ne fosforilira jedna druga kinaza, kazein-kinaza II. Tek nakon što ova kinaza djeluje na glikogen-sintazu a, okida se konformacijska promjena koja će omogućiti dostupnost ciljnih aminokiselina glikogen-sintaza-3-kinazi te ona sada može deaktivirati ovaj enzim. Djelovanje enzima GSK3 pod kontrolom je inzulina. Inzulin pokreće signalnu kaskadu koja dovodi do aktivacije enzima protein-kinaza B (PKB). Jedna od mnogih uloga ove kinaze fosforilacija je GSK3, čime se inhibira njezina fosforilacijska aktivnost te je ona onemogućena fosforilirati i tako inhibirati aktivnost glikogen-sintaze. Inzulin stoga ima učinak uklanjanja viška glukoze iz organizma na način da omogućuje djelovanje glikogen-sintaze. Osim djelovanja na GSK3, inzulin aktivira PP1, što defosforilira inaktivnu glikogen-sintazu te ju prevodi u aktivan oblik. Višak glukoze stoga povezujemo s defosforiliranom (neaktivnom) glikogen-fosforilazom i defosforiliranom (aktivnom) glikogen-sintazom, a nedostatak glukoze povezujemo s fosforiliranom (aktivnom) glikogen-fosforilazom i fosforiliranom (inaktivnom) glikogen-sintazom. Iz navedenog se vidi da se ovaj metabolički put regulira na nekoliko razina putem selektivnih fosforilacija i defosforilacija u svrhu održavanja homeostatske razine glukoze, osnovnog metabolita u organizmu. Fosforilacija nije jedina razina regulacije djelovanja ovih enzima, no to u kontekstu PTM nije relevantno.



Slika 16: Regulacija metabolizma glikogena fosforilacijom (preuzeto i prilagođeno prema³).

Kao što je gore navedeno, inzulin je hormon koji ima brojne učinke u stanici. Receptor za inzulin sastoji se od dvije α -podjedinice koje se nalaze s vanjske strane stanične membrane i dvije transmembranske β -podjedinice koje se nalaze u citosolu. Vanjske podjedinice tvore vezno mjesto za inzulin. Vezanje inzulina okida autofosforilacijsku aktivnost citosolnih podjedinica te one jedna drugu fosforiliraju na po tri tirozinska bočna ogranka. Stoga se inzulinski receptor smatra receptorskom tirozin-kinazom. Rezultat ove autofosforilacije okidanje je konformacijske promjene koja za rezultat ima formiranje pravilnog aktivnog mjesta tako da ovaj receptorni enzim sada može fosforilirati druge proteine. Jedan od tih proteina je i IRS-1 protein. Njegovom fosforilacijom omogućuje se interakcija s drugim proteinima ovog signalnog puta (Slika 17). Jedan od ovih proteina je fosfoinozitol-3-kinaza (PI-3K). Ovaj enzim fosforilira fosfaditilinozitol-4, 5-bisfosfat u fosfaditilinozitol-3, 4, 5-trisfosfat (PIP_3). Ranije je napomenuto da kinaze ne fosforiliraju samo proteine. PIP_3 sada veže protein-kinazu B (PKB) te ju pozicionira na fosforilaciju djelovanjem enzima PDK1, čime se PKB aktivira. Ova kinaza zaista ima

pregršt uloga u stanici, a jedna od njih je fosforilacija, odnosno inaktivacija GSK3 te je na ovaj način produljeno djelovanje glikogen-sintaze. Dodatan učinak protein-kinaze B ugradnja je transportera GLUT u staničnu membranu kako bi se povećao unos glukoze u stanicu i omogućilo adekvatnu razinu supstrata glikogen-sintazi.



Ovaj signalni put naveliko demonstrira veliku važnost fosforilacije jer u ovom signalnom putu gotovo da nema koraka koji nije neovisan o pojedinoj kinazi. Intenzivnim istraživanjima otkriven je ogroman broj signalnih puteva koji su, analogno ovome, ovisni o nizu kinaza.

Slika 17: Signalni put aktivacije glikogen-sintaze inzulinom (preuzeto i prilagođeno prema³).

5.4. Primjeri fizioloških i staničnih uloga fosforilacije

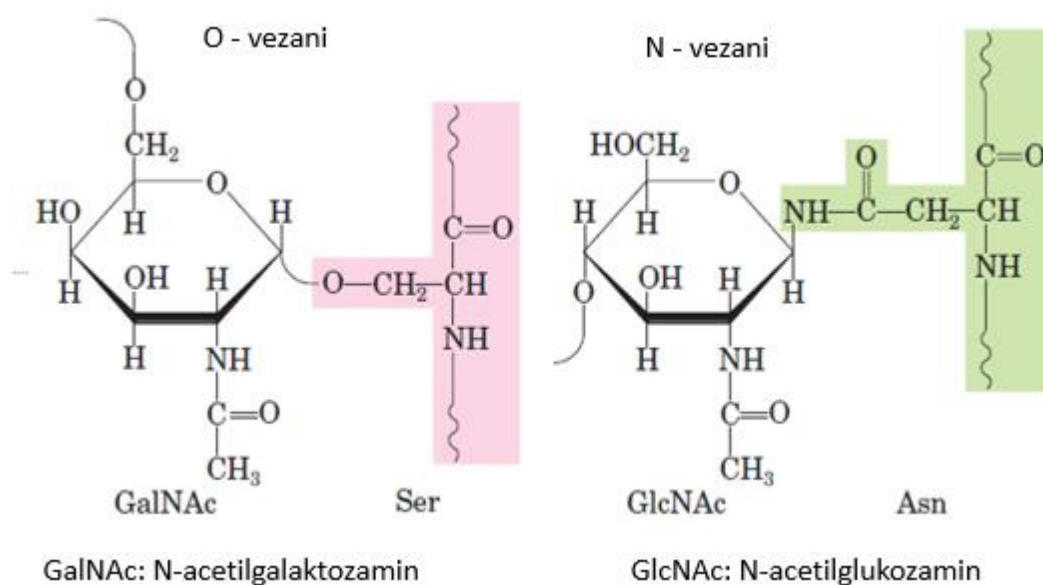
Fosforilacija je proces prisutan u kontrakciji glatkog mišića¹⁹. Kalmodulin je protein koji ima četiri vezna mjesta za kalcijeve ione. Porastom unutarstanične koncentracije kalcija u mišićnoj stanici glatkog mišića kalmodulin veže kalcij te stupa u interakciju s kinazom lakog lanca miozina (engl. *myosin light chain kinase*, MLCK). Ovom interakcijom ova kinaza se aktivira te fosforilira lake lance glavice miozina, čime se poveća njihova ATP-azna aktivnost, čime se oslobađa energija potrebna za pokretanje procesa kontrakcije. Pri smanjenju koncentracije kalcija MLCK se inaktivira, a aktivira se enzim miozinska fosfataza te on uklanja fosfat s miozina, čime se glatki mišić relaksira. Protein p53 spomenut je ranije u sklopu acetilacije¹². Kao što je ranije navedeno, acetilacija nije jedina PTM koja se odvija na ovom proteinu. Fosforilacija također aktivira ovaj protein i omogućuje njegovu protutumorsku ulogu. Fosforilacija može utjecati na razinu ekspresije pojedinih gena³. Primjer je inzulin, koji osim djelovanja na metaboličke procese sudjeluje u signalnim putevima koji kao rezultat imaju povećanje ekspresije pojedinih gena. Stanična dioba također je pod utjecajem ove PTM, posredstvom proteina zvanih ciklini i pripadajućih kinaza ovisnih o ciklinu. Fosforilacija ima mnogostruke uloge u procesu razvoja te su mnoge embionalne deformacije povezane s defektnim kinazama, odnosno fosfatazama. Također su poznate mnoge uloge fosforilacije u procesima apoptoze, prometa molekula (primjer je natrij/kalijeva crpka), upalnim procesima te tumorigenezi¹⁵. Mutacije u genima koji kodiraju za pojedine kinaze i fosfataze stoga su molekularna osnova cijelog niza različitih bolesti i poremećaja te zbog toga fosfoproteomika dobiva sve veću i veću važnost.

6. GLIKOZILACIJA

6.1. Uvod u glikozilaciju, glikoproteini i proteoglikani

Ugljikohidrati imaju centralnu metaboličku ulogu u gotovo svim živim stanicama te značajnu strukturnu ulogu, osobito u biljnih stanica³. Osim ovih uloga, oligosaharidi i polisaharidi povezuju se s drugim makromolekulama, kao što su proteini i lipidi, gdje ugljikohidrati obavljaju važnu ulogu usmjeravanja proteina u pojedine unutarstanične odjeljke te posreduju specifične interakcije između stanica te stanica s izvanstaničnim matriksom, staničnu adheziju, migraciju stanica pri razvojnim procesima i imunološkom odgovoru te mnoge druge uloge. U većini slučajeva, kao i kod većine dosad spomenutih PTM, vezanjem ugljikohidrata protein se prevodi u biološki aktivan oblik. Proteoglikani su makromolekule koje se mahom nalaze na staničnoj površini ili kao sastavni dio izvanstaničnog matriksa. Uglavnom se sastoje od glikozaminoglikana kovalentno povezanih na membranski ili sekrecijski protein. Ugljikohidratni dio ovih konjugata veći je i kompleksniji dio molekule te obavlja biološku ulogu, dok je protein pasivni nosač ugljikohidratnog dijela. Glikoproteini su također konjugati ugljikohidrata kovalentno povezanih na proteine. Za razliku od proteoglikana, ugljikohidratni dio glikoproteina zauzima znatno manji maseni udio u ovim konjugatima te aktivnu biološku ulogu obavlja protein, dok ugljikohidrat ima ulogu usmjeravanja proteina te ostvarivanje interakcija s drugim proteinima. Ugljikohidratni dio znatno je raznolikijeg sastava i strukture kod glikoproteina nego što je to kod proteoglikana.

Glikozilacija je proces povezivanja proteina s ugljikohidratom kovalentnom vezom koju zovemo glikozidna veza. Ovo je jedna od najkompleksnijih i strukturno najraznolikijih skupina PTM koja se odvija u sve tri domene života, no značajno više kod biljnih i animalnih stanica. Povezivanje preko bočnog ogranka serina ili treonina zovemo O-glikozilacija, a povezivanje preko amida bočnog ogranka asparagina zovemo N-glikozilacija. Slika 18 prikazuje ova dva osnovna tipa glikozilacije. Osim ova osnovna dva tipa poznati su i drugi tipovi glikozilacije. Ovaj proces uključuje 8 aminokiselina te najmanje 13 različitih monosaharida. Glikozilacija se uobičajeno započinje kotranslacijski u endoplazmatskom retikulumu te se završi u Golgijevom kompleksu.



Slika 18: O- i N-glikozilacija (preuzeto i prilagođeno prema ³).

6.2. O-glikozilacija

O-glikozilacija vezanje je šećera na protein putem kovalentne veze između anomernog ugljikovog atoma šećera i hidroksilne skupine bočnog ogranka pojedinih aminokiselina²⁰⁻²². Ovaj tip glikozilacije odvija se i u biljnim i u animalnim stanicama te ima ulogu u međustaničnim interakcijama, signalizaciji i prepoznavanju proteina, kao i smatanju, stabilnosti i aktivnosti sekrecijskih proteina. Struktura O-glikoproteina znatno se razlikuje između biljnih i animalnih stanica. U biljaka O-glikoproteini se većinom nalaze unutar obitelji glikoproteina bogatih hidroksiprolinom (HRGP)^{21,22}. To je skupina sekrecijskih proteina koji se nalaze u staničnoj stijenci. Većina ovih proteina modificirana je arabinozom, galaktozom ili arabinogalaktanima (većinski dio galaktoza, manji dio arabinoza). Samom procesu glikozilacije prethodi važna modifikacija prolina u hidroksiprolin (Hyp) putem enzima koji se zovu prolil-4-hidroksilaze. Ova modifikacija potrebna je zbog toga što prolin, kao prvo, nema klasičan bočni ogranak kao ostale aminokiseline, već je njegov bočni ogranak povezan na α -amino skupinu, tvoreći tako sekundarni amin, a kao drugo, u bočnom ogranku nema hidroksilne skupine koja bi primila ugljikohidrat. Ovi enzimi djeluju i u endoplazmatskom retikulu i Golgijevom kompleksu. Hidroksiprolin se zatim glikozilira arabinoglikanskim ili arabinoznim lancima te pojedinim molekulama galaktoze djelovanjem skupine enzima koji se zovu glikoziltransferaze. Svaki od ovih primjera O-glikozilacije vrlo je specifičan te ovisi o točno određenom slijedu aminokiselina. Primjerice, arabinozilacija se odvija samo u proteinu koji ima uzastopno ponavljanje dipeptidnog slijeda Ser-Hyp4. U animalnih stanica ovaj tip glikozilacije ne odvija se predominantno na prolinu, već se odvija i na serinu, treoninu, tirozinu i hidroksilzinu. Najpoznatiji primjer u životinja je O-glikozilacija na mucinima, glikoproteinima koji su sastavni dio sluzi. Inicijaciju ovog tipa modifikacije počinje skupina enzima zvanih N-acetilgalaktozamintransferaze, koji kataliziraju prijenos jedne molekule N-acetilgalaktozamina (GalNAc) na bočni ogranak serina ili treonina. Elongaciju ugljikohidratnog dijela ovih glikoproteina obavlja niz glikoziltransferaza lokaliziranih u Golgijevom kompleksu. Ovi glikoproteini imaju mnoge uloge, a neke od njih su regulacija aktivnosti citokina te organizaciji pojedinih tkiva. Vrlo značajan primjer O-glikozilacije u animalnih tkiva je i kolagen, protein koji sadrži mnogo lizina i prolina. Bočne ogranke ovih aminokiselina za primanje ugljikohidratnog sadržaja pripremaju enzimi prolilhidroksilaza i lizilhidroksilaza. Osim glikozilacije N-acetilgalaktozaminom, česta je i O-glikozilacija N-acetilglukozamina (GlcNAc), no za razliku od N-acetilgalaktozamina, na koji se nadograđuju dodatni šećeri, N-acetilglukozamin ostaje kao zaseban šećer vezan za protein. Također su poznati manoproteini koji se nalaze u staničnoj stijenci kvasca te mnogi drugi primjeri O-glikozilacije^{21,22}.

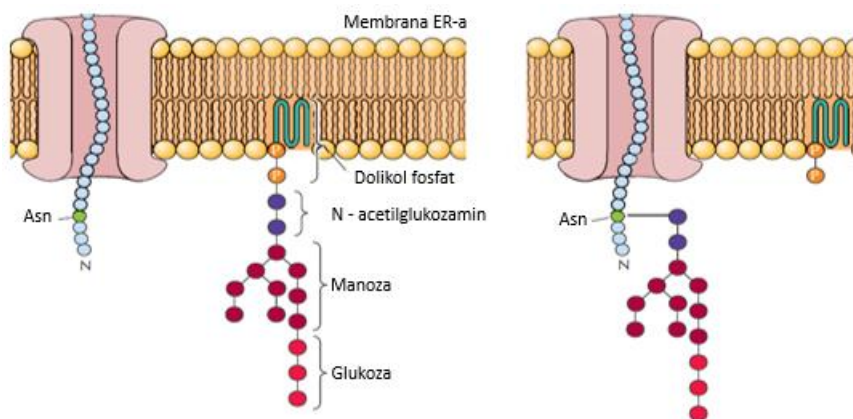
O-glikozilacija i biljnih i animalnih stanica stabilizira te glikoproteine te ih čini otpornima na temperaturu i djelovanje proteaza. Osim toga, pojedini glikoproteini imaju bolju topljivost od samih proteina. Pojedini biljni O-glikoproteini također pokazuju uloge u obrani od patogena i signalizaciji u embriogenezi biljnog organizma. Konačno, O-glikani imaju važnu ulogu u prepoznavanju proteina te protein-protein interakcijama^{21,22}.

6.3. N-glikozilacija

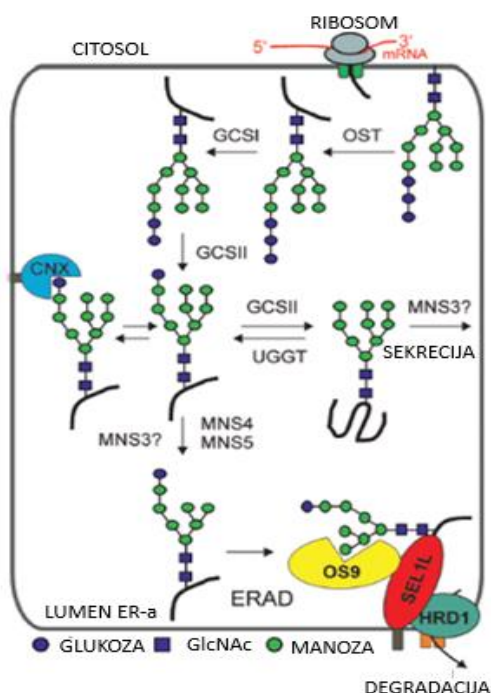
N-glikozilacija proces je enzimski kataliziranog nastanka β -glikozilaminske veze između N-acetilglukozamina oligosaharida i bočnog ogranka asparagina koji se nalazi u specifičnom slijedu aminokiselina Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr^{21,23}. X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina jer prolin svojom rigidnom strukturom destabilizira konformaciju proteina ako se na tom mjestu primi oligosaharid. Navedeni slijed aminokiselina dokazan je ciljanom mutagenезom; promjenom bilo koje od specifičnih aminokiselina u ovom slijedu onemogućuje se prijenos oligosaharida na protein. To se događa vjerojatno iz razloga što ovaj slijed aminokiselina najbolje odgovara ostvarivanju najvećeg broja

interakcija s enzimom koji prenosi oligosaharid na protein. Valja naglasiti da je ovaj aminokiselinski slijed vrlo čest u proteinima, no to ne znači da je protein N-glikozilirani na svakom ovom slijedu, što se pripisuje konformaciji proteina u kojoj nije svaki ovaj slijed dostupan za modifikacije. N-glikozilacija mnogo je češća PTM od O-glikozilacije te se smatra da je preko 50% humanih proteina N-glikozilirano, osobito imunoglobulini seruma, što pokazuje da N-glikozilacija omogućuje jednu dodatnu razinu varijabilnosti protutijela kao sastavni dio borbe imunološkog sustava protiv antigena. N-glikozilacija proces je koji se ne odvija prema kalupu, što je upravo razlog zašto ova PTM pokazuje toliku raznolikost. Točan broj pojedinih N-glikoziliranih oligosaharida još uvijek je nepoznat, no procjenjuje se da se broj ovih PTM može brojati u tisućama. Valja naglasiti da mnoštvo proteina također posjeduje i N- i O-glikozilirane oligosaharide.

Kod svih eukariota procesiranje N-glikoproteina započinje u endoplazmatskom retikulumu. Prvi korak u N-glikozilaciji kotranslacijski je prijenos osnovnog oligosaharida od 14 šećernih ostataka, građenog od dva N-acetilglukozamina, tri glukoze i devet manoze na asparagin polipeptida koji se kotranslacijski usmjerava u endoplazmatski retikulum. Enzimski kompleks koji obavlja ovaj prijenos zove se oligosaharil transferaza te se također nalazi integriran u membrani endoplazmatskog retikuluma. Membrana endoplazmatskog retikula sadrži lipidni nosač zvan dolikol fosfat (Slika 19), na kojem se navedeni oligosaharid nalazi vezan fosfoamidnom vezom te čeka prijenos na asparagin novog proteina.



Slika 19: Prijenos osnovnog oligosaharida na asparagin u lumenu ER-a (preuzeto iz²⁴).

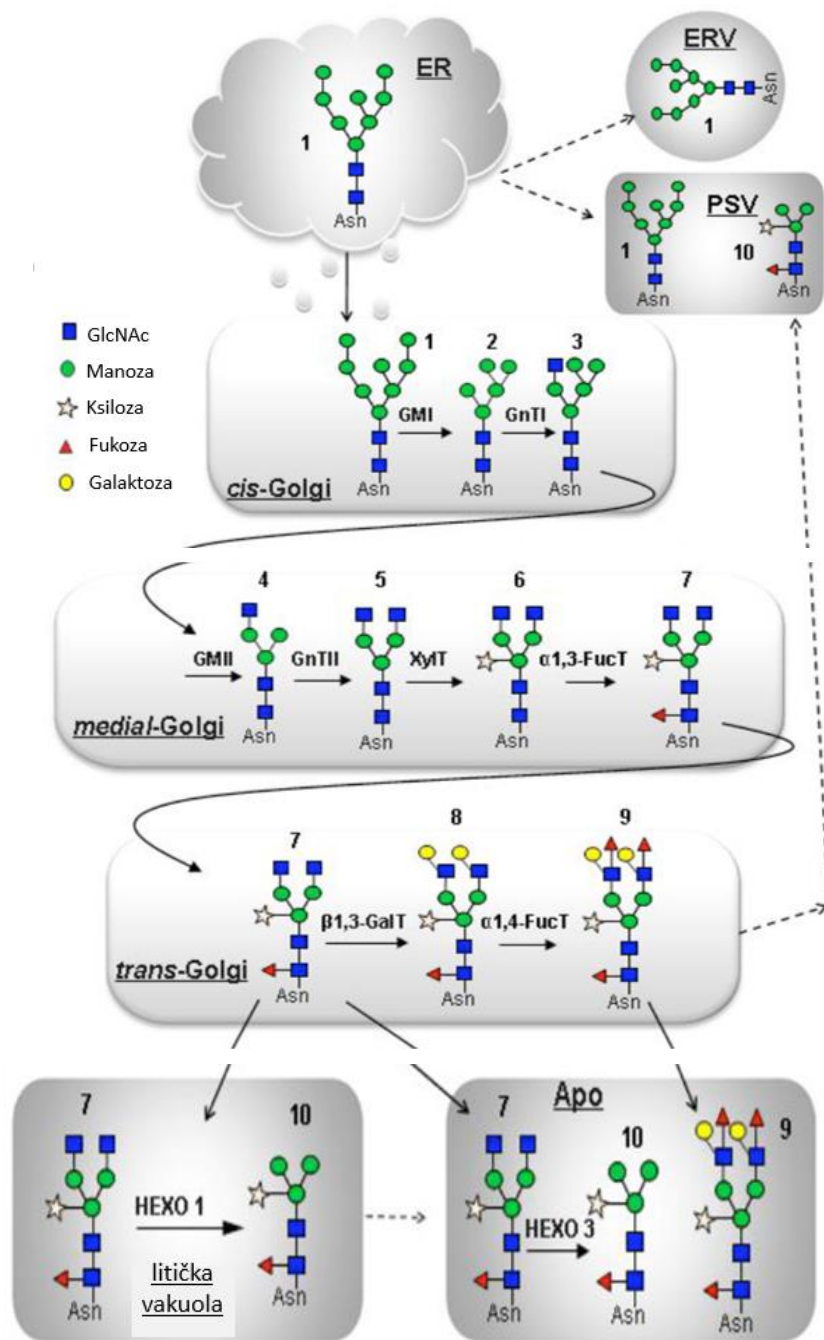


Slijedi procesiranje prenesenog osnovnog oligosaharida u endoplazmatskom retikulumu koje započinje uklanjanjem dvije glukoze djelovanjem enzima α -glukozidaza (Slika 20). Prije daljnjeg procesiranja nesmotani glikoprotein ostvaruje interakcije s proteinima kalneksinom i kalretikulinom koji omogućuju pravilno smatanje glikoproteina. Uklanjanjem i zadnje glukoze na oligosaharidu smanjuje se afinitet vezanja kalneksina i kalretikulina te se oni otpuštaju i podvrgavaju daljnjem procesiranju. Zadnji korak procesiranja oligosaharida koji se odvija u endoplazmatskom retikulumu uklanjanje je jedne manoze u srednjem lancu oligosaharida djelovanjem enzima α -manozidaze. Upitnik na Slici 20 upućuje na to da kod pojedinih biljaka nije pronađen ovaj izozim manozidaze te se pretpostavlja da se u slučaju nedostatka ovog enzima u endoplazmatskom retikulumu

Slika 20: Procesiranje N-glikana u endoplazmatskom retikulumu (preuzeto i prilagođeno prema²¹).

ovaj korak modifikacije obavlja na spojištu endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog kompleksa ili pak u Golgijevom kompleksu, što je predmet aktivnog istraživanja. Pokazano je da biljke koje imaju mutiran gen koji kodira za ovaj enzim imaju brojne defektne N-glikoproteine. Na drugu stranu, pokazano je u biljke *Arabidopsis thaliana* da enzim β 1, 2-N-acetilglukozamin-transferaza prenosi GlcNAc na ovu manozu, što djelomično suprimira učinke ovih defektnih glikoproteina u embrionalnom razvoju. Proteini koji se nisu pravilno smotali usmjeravaju se u razgradni put ERAD (engl. *ER-associated degradation*), koji započinje cijepanjem dodatnih manozna pomoću dodatnih manozidaza, što dovodi do izlaganja α 1, 6-manoze koja služi za prepoznavanje od strane proteina OS9, a to predstavlja signal za ulazak u razgradne puteve u endoplazmatskom retikulumu. Ovaj proces prepoznavanja aberantnih glikoproteina odvija se po sličnom mehanizmu kod biljaka, životinja i kvasca.

Daljnje modifikacije odvijaju se u Golgijevom kompleksu te obuhvaćaju uklanjanje, odnosno dodavanje pojedinih šećera kako glikoprotein prolazi kroz cisterne Golgijevog kompleksa (Slika 21). Prva modifikacija koja se odvija u Golgijevom kompleksu uklanjanje je terminalne tri manoze djelovanjem enzima α 1,2 manozidaze I u cis-Golgijevoj cisterni. Ovim procesom nastaje supstrat za nastanak hibridnih i kompleksnih, strukturno vrlo raznolikih N-glikana. Slijedi dodavanje N-acetilglukozamina. Ovaj korak zajednički je i biljkama i životinjama zbog toga što je presudan za daljnje modifikacije koje će uslijediti. Ova enzimska transformacija također se odvija u cis-Golgijevoj cisterni. Nakon ovog koraka situacija se komplicira te se u pojedinim stanicama odvijaju raznolike modifikacije. Jedan od najpoznatijih nizvodnih puteva cijepanje je dodatne dvije manoze enzimom manozidaza II u medijalnoj cisterni Golgijevog kompleksa. Uklanjanje manoze popraćeno je, kod biljaka i kod drugih viših eukariota dodatkom N-acetilglukozamina na preostalu slobodnu terminalnu manozu. Slijedi dodatak ksiloze na manozu na mjestu grananja djelovanjem enzima β 1,2-ksiloziltransferaze te dodatak fukoze na bazni N-acetilglukozamin djelovanjem enzima α 1,3-fukoziltransferaze. Ovim se završavaju modifikacije u medijalnoj cisterni Golgijevog kompleksa. Zadnji koraci modifikacije obavljaju se u trans-Golgijevom kompleksu, gdje se djelovanjem enzima β 1,3-galaktoziltransferaza prenosi na svaki terminalni N-acetilglukozamin po jedna molekula galaktoze te na kraju se dodaju dvije molekule fukoze, po jedna na svaki terminalni GlcNAc, djelovanjem enzima α 1,4-fukoziltransferaza, čime nastaje generalna i najčešća oligosaharidna struktura N-glikana u biljaka, a oligosaharidi slične strukture nalaze se i u animalnim stanicama. U biljnim stanicama ovo je konačna struktura te nema dodatnih koraka elongacije. U animalnim se stanicama javljaju se dodatni elongacijski koraci, kao što je dodavanje sijalinske kiseline na terminalne molekule galaktoze te brojne druge modifikacije. Ovo je generalna modifikacija koju prolaze svi N-vezani glikoproteini namijenjeni ugradnji u staničnu membranu ili sekreciji. Daljnje modifikacije u pojedinim tipovima stanicama ovise o enzimima prisutnim u Golgijevom kompleksu tih stanica, što će konačno utjecati na funkciju tih glikoproteina. Pojedini organeli sadrže enzime koji će odstraniti određene dijelove ovog oligosaharida, primjerice enzim β -N-acetilheksoaminidaza (HEXO1) u vakuoli (Slika 21). Glikoproteini namijenjeni odlasku u lizosome imaju nešto drugačiji obrazac glikozilacije. Oligosaharidi ovih glikoproteina ne podvrgavaju se početnom uklanjanju tri manoze, već se na njih prenosi N-acetilglukozamin fosfat, a zatim N-acetilglukozamin uklanja, što ostavlja terminalne manozna-6-fosfate. Ova modifikacija esencijalna je za unos ovih glikoproteina u lizosome. Osim toga, specifičan obrazac glikozilacije lizosomskih proteina nužan je kao zaštitna mjera od lizosomskih kiselih proteaza^{21,23}.



Slika 21: Procesiranje N-glikana u Golgijevom kompleksu (preuzeto i prilagođeno prema²³).

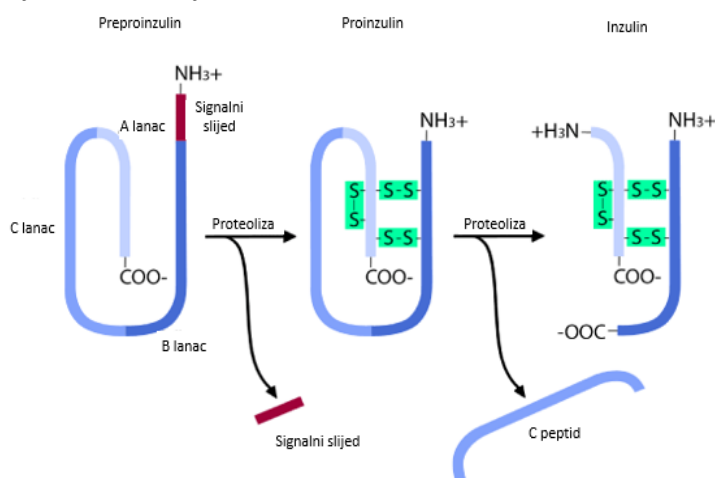
6.4. Ostali tipovi glikozilacije

Fosfoglikozilacija je proces enzimskog prijenosa šećera na protein nastankom fosfodiesterске veze²⁰. Zasad su poznata dva primjera: GlcNAc-1-fosfotransferaza u skupini *Dictyostelium* i Man-1 fosfotransferaza u skupini *Leishmania*. C-manozilacija je proces enzimskog prijenosa manoze preko C-1 atoma manoze na C-2 atom indolnog prstena triptofana u slijedu Trp-X-X-Trp, u kojem se prvi triptofan modificira. Ovaj motiv nalazi se u određenom broju proteina sisavaca. Glipijacija je prijenos glikozilfosfatidilinozitolnog sidra na C-kraj pojedinih proteina enzimom transamidazom koji također cijepa C-kraj pri ovom procesu. Ova modifikacija odvija se vrlo rano na citosolnoj strani endoplazmatskog retikuluma te prethodi translokaciji proteina u lumen endoplazmatskog retikuluma. S-glikozilacija podrazumijeva dodatak šećera na bočni ogranak cisteina, no ovaj tip glikozilacije ekstremno je rijedak²⁰.

7. PROTEOLIZA

7.1. Uvod i proteaze

Proteoliza je proces spontanog ili enzimski kataliziranog cijepanja proteina na manje proteine ili polipeptide²⁵. Neenzimsko cijepanje peptidnih veza vrlo je sporo te se u stanicama događa katalizirano enzimima koje zovemo proteaze. Proteaze su grupirane u pet skupina enzima s obzirom na aminokiselinu ili metal koji se nalazi u aktivnom mjestu. Stoga imamo serinske, treoninske, cisteinske, aspartanske i metaloproteaze. Proteoliza u stanici ima mnoge uloge, kao što su kontrola koncentracije pojedinih proteina, osobito u signalnim putevima, opća degradacija nepotrebnih ili oštećenih proteina, u apoptozi te uklanjanje regulacijskih proteina. Ipak, u sklopu PTM razmatra se uloga proteolize u prevođenju biološki inaktivnih proteina u njihov aktivan oblik. Proteaze pokazuju visok stupanj specifičnosti prema svojim supstratima, koja proizlazi iz primarne i tercijarne strukture supstrata, gubitku proteina koji je uslijed interakcija s ciljnim proteinom skrivao ciljni slijed aminokiselina na ciljnom proteinu te kolokalizaciji proteaze i pripadnog supstrata. Stoga se u procesu proteolitičke aktivacije često mijenja subcelularna lokalizacija pojedinog proteina. Također je poznat fenomen tzv. sekvencijske proteolize, procesa u kojem jedna proteaza djeluje na ciljni protein kako bi se oslobodio pristup za djelovanje druge proteaze na isti ciljni protein, a dobar primjer je inzulin (Slika 22). Mnoge proteaze također se sintetiziraju kao inaktivni prekursori koje zovemo zimogeni ili proenzimi. Primjer su tripsin (inaktivni tripsinogen), kimotripsin (inaktivni kimotripsinogen), trombin (protrombin) i mnogi drugi. Ovaj termin nije ograničen samo na enzime pa tako poznajemo i mnoge neenzimske proteine koji se sintetiziraju u inaktivnom obliku, da bi se enzimskim cijepanjem preveli u biološki aktivan oblik;



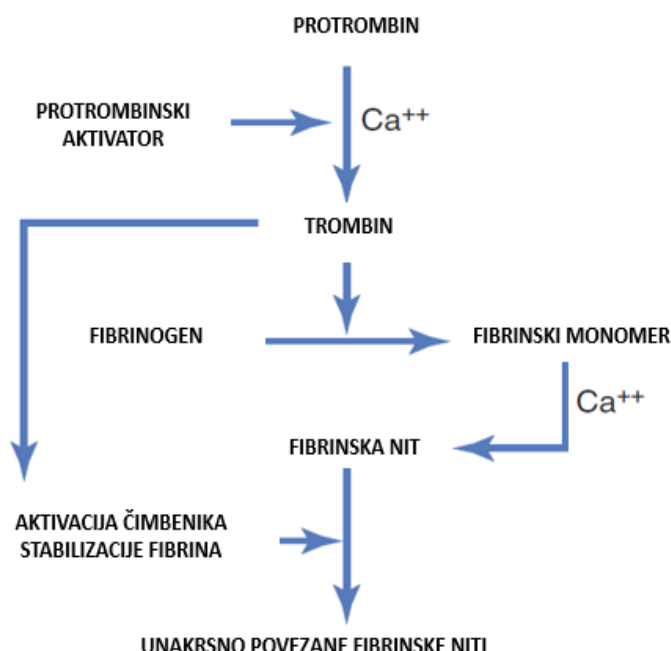
tako procesiranjem fibrinogena nastaje fibrin te procesiranjem proinzulina nastaje inzulin. Stoga je primjereniji termin proprotein koji obuhvaća sve inaktivne prekursore aktivnih proteina. Proteoliza je spomenuta u trećem poglavlju, u sklopu modifikacije N-kraja uklanjanjem metionina posredstvom enzima metioninskih aminopeptidaza. Valja napomenuti da se termini proteaze i peptidaze odnose na istu skupinu enzima.

Slika 22: Proteolitičko procesiranje inzulina (preuzeto i prilagođeno prema²⁶).

Dodatan primjer je uklanjanje signalnih sljedova koji proteine kotranslacijski usmjeravaju u pojedine stanične odjeljke. Proteoliza se generalno smatra ireverzibilnim procesom, odnosno jednom pocijepani inaktivni prekursor konstitutivno je aktivan. Stoga je potrebna dodatna regulacija jednom aktiviranih proproteina, a ona se postiže ili okolišnim uvjetima u pojedinim unutartaničnim odjeljcima (primjerice koncentracija soli) ili prirodnim inhibitorima, kao što je to slučaj za tripsin i kimotripsin, koji se inaktiviraju vezanjem proteina u njihovo aktivno mjesto. Vezani proteini nisu supstrat ovih enzima pa se tako njihova aktivnost obustavlja. Osim što se mnogi proteini proteolizom aktiviraju, postoje i mnogi proteini koji se proteolizom inaktiviraju, odnosno gube svoju biološku ulogu. Stoga se proteaze uključene u signalne puteve smatraju regulatorima prekidačima²⁵. Osim u signalnim putevima, proteoliza također ima i velik fiziološki utjecaj, pogotovo u imunološkom sustavu i mehanizmu grušanja krvi, o čemu će više riječi biti u sljedećoj sekciji.

7.2. Mehanizam grušanja krvi i komplement predstavljaju sustav inaktivnih proenzima

Hemostaza je proces zaustavljanja krvarenja¹⁹. Ovo je složen proces koji je pod kontrolom lokalnih tkivnih čimbenika i krvnih proteina koji omogućuju nastanak ugruška koji će začeptiti oštećenu krvnu žilu. Naime, u krvi konstantno kruži skup proteina koji će se u slučaju prekida krvne žile aktivirati i spriječiti krvarenje. Glavna dva proteina ovog procesa zovu se protrombin i fibrinogen. Protrombin je



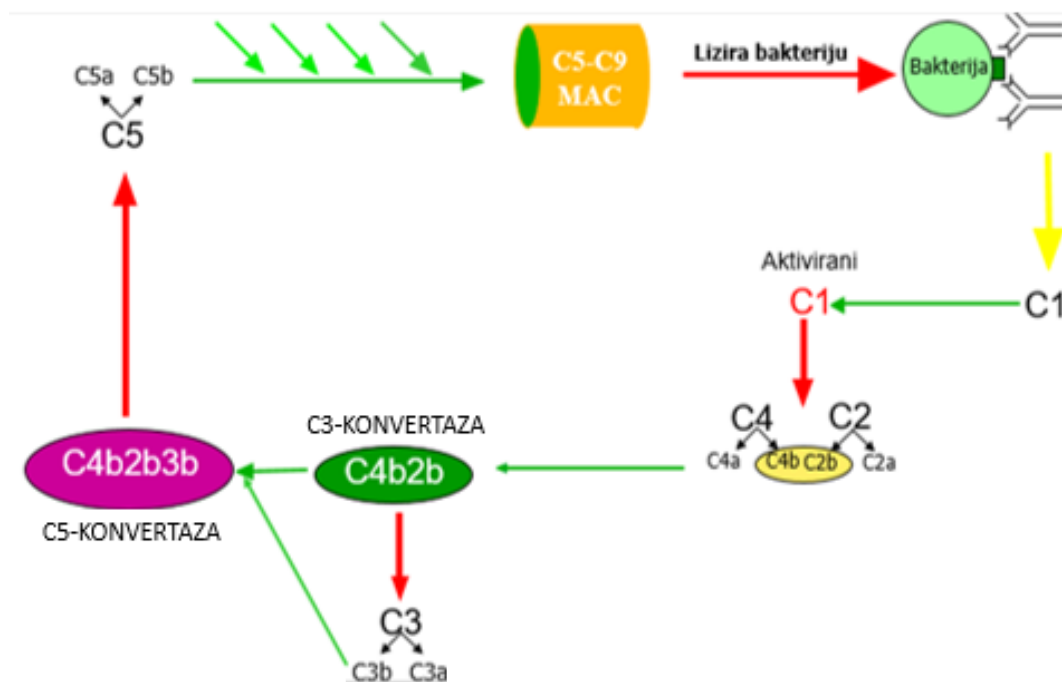
zimogen koji se proizvodi u jetri te se otpušta u ovom inaktivnom obliku u krv, gdje cirkulira do aktivacije. Fibrinogen je protein koji također nastaje u jetri i cirkulira u krvi. Aktivacijom protrombina cijepanjem na dva mjesta nastaje aktivni enzim trombin. To je serinska proteaza kojoj je supstrat fibrinogen. Katalitičkim cijepanjem fibrinogena nastaje fibrin (Slika 23). Ovim procesom se otkrivaju mjesta na fibrinu koja omogućuju polimerizaciju molekula fibrina u dužke niti. Za oba procesa potrebna je dostatna količina kalcijevih iona. Nastale niti fibrina umrežuju se i zapletu eritrocite, trombocite te ostale sastojke krvi i tako nastali ugrušak sprječi izlivanje krvi.

Slika 23: Shematski prikaz nastanka fibrinskih niti (preuzeto i prilagođeno prema¹⁹).

Postoje dva puta aktivacije protrombinskog aktivatora, također krvnog zimogena koji će nakon aktivacije pocijepati protrombin i pokrenuti kaskadu grušanja krvi. Vanjski put aktivacije kaskada je događaja koju pokreću tvari izvan krvi, a unutarnji put aktivacije kaskada je događaja koju pokreću faktori koji se svi nalaze u krvi. Oba procesa konvergiraju prema istom cilju, a to je aktivacija proenzima protrombinskog aktivatora koji će proteolitički djelovati na protrombin i omogućiti proces grušanja krvi. Nakon popravka štete, odnosno regeneracije oštećene krvne žile potrebno je razgraditi ugrušak kako on ne bi smetao cirkulaciji krvi. Ovaj proces također obavlja aktivirani proprotein koji se zove profibrilizin. Njegovim cijepanjem nastaje fibrolizin koji proteolitički djeluje na protrombin, fibrinogen i fibrin. Ovaj enzim ne cijepa navedene proteine na mjestima na kojima se cijepaju kako bi se aktivirali, već ovaj enzim jednostavno razgrađuje ove proteine kada njihova uloga više nije potrebna. Na početku je rečeno da je proteolitička aktivacija ireverzibilna te da je potrebno regulirati aktivnost ovih enzima. Takav je slučaj i s plazminom. U krvi se također nalazi protein antiplazmin koji ima ulogu inhibitora plazmina. Stoga je sustav proteina za grušanje krvi odličan primjer svih aspekata ove PTM, a to su proteolitička aktivacija, proteolitička inaktivacija i inhibicija aktivnosti ireverzibilne aktivacije zimogena¹⁹.

Komplement je sustav koji se sastoji od tridesetak proteina koji cirkuliraju u krvi te po potrebi djeluju kao posrednici imunološkog humoralnog odgovora¹⁹. Serumske komponente komplementa sintetiziraju se kao inaktivni prekursori svoje aktivne forme te kao takvi cirkuliraju u krvi i aktiviraju se kada je to potrebno. Postoje tri načina aktivacije komplementa, a to su klasični put, lektinski put i alternativni put. Ovdje će biti opisan samo klasični put aktivacije. Klasičan put aktivacije sustava komplementa moguć je samo uslijed infekcije u krvožilnom sustavu. Naime, prva komponenta komplementa zove se C1 te ju je moguće aktivirati samo interakcijom s protutijelom koje je prošlo

konformacijsku promjenu uslijed vezanja antigena. Komponenta komplementa C1 sastoji se od jedne podjedinice C1q, dviju podjedinica C1r i dviju podjedinica C1s; svih pet podjedinica na okupu se drže preko kalcijevih mostova. Molekula C1q veže molekule protutijela te zajedno s C1r proteolitički djeluje na C1s te one sada poprimaju enzimsku aktivnost. Na ovaj način je iz C1 komponente komplementa nastao enzim kojem su supstrati komponente komplementa C2 i C4 (Slika 24). Cijepanjem C2 nastaju veća podjedinica C2b i manja podjedinica C2a. Također, cijepanjem C4 komponente nastaju veća podjedinica C4b i manja podjedinica C4a. Protein – protein interakcijama između podjedinica C2b i C4b formira se aktivno mjesto te je nastao novi enzim koji se zove C3 – konvertaza. Ovom enzimu supstrat je C3 komponenta komplementa; njezinom razgradnjom nastaju podjedinice C3a i C3b. C3b se veže na staničnu membranu bakterijske stanice te predstavlja mjesto vezanja drugih komponenti imunološkog sustava, primjerice protutijela. C3b također stupa u interakciju s C3 – konvertazom te oformi novi enzim koji se zove C5 – konvertaza. Ovaj enzim cijepa komponentu C5 na C5a i C5b. C5b se veže na staničnu membranu i sada dovodi komponente C6, C7, C8 i C9, koje će zajedno tvoriti pore na bakterijskoj staničnoj membrani, što ubija bakteriju. Također, komponente C3a, C4a i C5a imaju važnu ulogu u imunološkom odgovoru. Ove molekule nastale proteolitičkim djelovanjem prethodno aktiviranih zimogena zovu se anafilatoksini te imaju brojne fiziološke uloge, kao što su otpuštanje vazoaktivnih tvari i aktivaciju drugih stanica imunološkog sustava, što kao rezultat ima amplifikaciju imunološkog odgovora. Ovo je još jedan odličan primjer sustava proproteina koji djeluju u kaskadi i kao rezultat imaju brojne biološke uloge koje nisu imali u svom prvotnom, proproteinskom obliku.



Slika 24: Klasični put aktivacije komplementa

Postoje određene sličnosti između ova dva mehanizma djelovanja, a to su ovisnost o kalcijevim ionima za ostvarivanje protein – protein interakcija te to da oba sustava predstavljaju proteini koji krvlju cirkuliraju kao proproteini te se njihova proteolitička aktivacija inducira u određenim uvjetima kada je aktivnost ovih proteina potrebna za održavanje homeostaze organizma¹⁹. Ovo su dva primjera koji zorno prikazuju na kojem principu funkcionira ova PTM te kako adicija pojedinih (kompleksnih) molekula nije jedini oblik modifikacije proteina.

8. KONJUGACIJA S DRUGIM PROTEINIMA

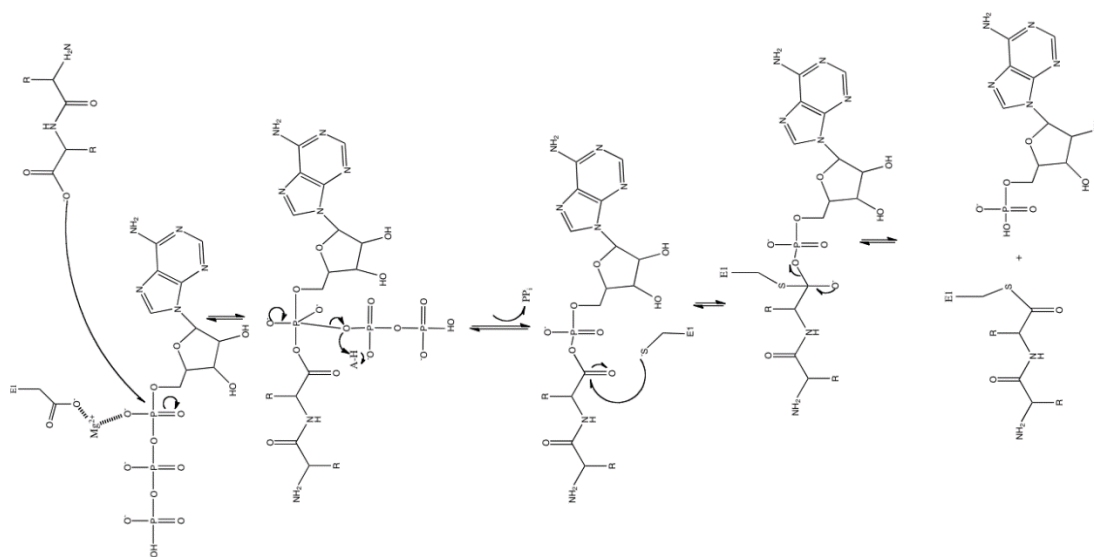
8.1. Ubikvitinacija – mehanizam i učinci

Ubikvitin (lat. *ubique* - posvuda) predstavnik je obitelji strukturno vrlo konzerviranih eukariotskih proteina koji reguliraju mnoštvo procesa u eukariotskoj stanici^{27,28}. Kod prokariota zasad nije pronađen funkcionalni analog ovih proteina tako da je ovaj tip PTM karakterističan isključivo za eukariotske stanice. Ipak, u prokariota su pronađeni strukturno analogni proteini koji obavljaju pojedine funkcije po mehanizmu analognom mehanizmu djelovanja ubikvitina. Ovi proteini se kovalentno vežu na ciljne proteine, čime utječu na stabilnost, aktivnost ili lokalizaciju ciljnog proteina. Ubikvitin je dodatan primjer proteina koji svoju funkcionalnu konformaciju postiže nakon proteolitičkog procesiranja. Karakteristika većine ovih proteina je to što na C-kraju imaju diglicinski motiv. Ovi proteini svi imaju sličan mehanizam djelovanja, a to je prijenos na ciljni protein putem nastanka izopeptidne veze između C-terminalnog glicina jednog od proteina ove obitelji i amino skupine ciljnog proteina, što može biti ε-amino skupina lizina ili N-terminalna amino skupina. U rijetkim slučajevima ubikvitin se može konjugirati s bočnim ogrankom serina, treonina i cisteina. Osim ubikvitina, ovoj proteinskoj obitelji pripadaju i proteini slični ubikvitinu (engl. *ubiquitin – like*, Ubl), a neke od njih su SUMO i NEDD8. Neki od njih su prisuni u svih eukariota, dok su neki identificirani samo u stanica sisavaca. Osim proteina koji se konjugacijom preko C-kraja vežu na proteine, poznati su i predstavnici ove proteinske obitelji koji su ugrađeni u druge proteine, no ne pokazuju biološku ulogu kao ubikvitin i drugi predstavnici. Oni se uglavnom nalaze na locirani na N-kraju pojedinih proteina te imaju vrlo velik stupanj strukturne analogije s ubikvitinom, no budući da im diglicinski motiv nije slobodan, oni predstavljaju inertnu domenu unutar tih proteina. Primarna struktura ubikvitina nevjerojatno je očuvana kod svih eukariota, što pokazuje činjenica da se ubikvitin izoliran iz kvasca razlikuje od onog izoliranog od čovjeka u svega tri aminokiseline, zbog čega se često navodi kao primjer evolucijski savršenog proteina, kao rezultat jakog selektivnog pritiska na organizme da zadrže ovu molekulu očuvanom. Ovo proizlazi iz brojnih bioloških funkcija ubikvitina, neke od kojih su usmjeravanje proteina na proteolitičku ili lizosomsku razgradnju, kao signal u prometu pojedinih proteina i mnogim drugim procesima. Osnovni mehanizam ubikvitinacije konjugacija je s ciljnim proteinom, što prepoznaju drugi proteini koji će djelovati na konjugirani produkt, ovisno o lokalizaciji nastalog konjugiranog produkta te vrsti i broju proteina koji se konjugiraju na ciljni protein. Također je pokazano da modifikacija proteina jednim proteinom ove obitelji sprječava konjugaciju drugim proteinom ove obitelji. Primjerice, adicija SUMO molekule sprječava adiciju ubikvitina na protein te sprječava biološku ulogu ubikvitina na tom proteinu. Katalitički mehanizam konjugacije ubikvitina i njemu srodnih proteina na ciljne proteine uglavnom se sastoji od tri koraka (Slika 25) i stoga je kataliziran s tri skupine enzima. Prvi korak predstavlja aktivaciju kataliziranu enzimima E1, drugi korak je prijenos ubikvitina na enzim skupine E2, a u trećem koraku enzim skupine E3, također zvan ubikvitin-ligaza prenosi ubikvitin s E2 na konačan supstrat, odnosno ciljni protein. Jednom preneseni ubikvitin na ciljni protein može sam biti ubikvitiniran na N-kraju ili jednom od nekoliko bočnih ograna lizina, što zovemo poliubikvitinacija. Ovdje se spominju i enzimi skupine E4, koji olakšavaju proces poliubikvitinacije^{27,28}.



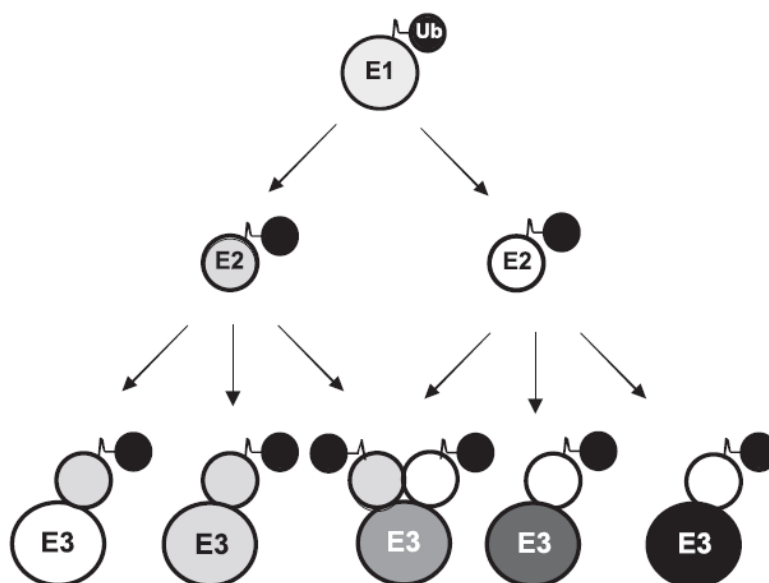
Slika 25: Shematski prikaz prijenosa ubikvitina na supstrat (preuzeto i prilagođeno prema ²⁷).

Slijedi detaljniji opis svakog od ovih koraka. Prvi je korak aktivacija C-kraja ubikvitina kako bi ga amino skupina supstrata mogla nukleofilno napasti. Ovaj korak katalizira enzim E1 (Slika 26). U prvom koraku hidroksilni kisikov atom karboksilne skupine C-kraja nukleofilno napada α -fosforov atom, čime nastaje acilna veza koja veže adenilat na C-kraj ubikvitina, uz izlazak pirofosfata (PP_i). Slijedi nukleofilni napad bočnog ogranka cisteina u aktivnom mjestu enzima E1 na karboksilni C atom C-kraja ubikvitina, kojim se vrši supstitucija AMP-a kao izlazne skupine te nastanka tioesterske veze između ubikvitina i E1. Velika većina proteina ubikvitinske porodice svaki ima zaseban enzim E1 (poznate iznimke kod Ubl proteina biljaka). Aktivno mjesto ovih enzima visoko je konzervirano u svih eukariota te sadrži aspartat koji veže magnezijev ion koordiniran s ATP-om, tri bazične aminokiseline koje će stabilizirati izlazni pirofosfat te cistein koji će izvršiti nukleofilni napad. Kod viših eukariota postoje dodatne komplikacije u samom mehanizmu jer je pokazano da neki organizmi imaju E1 koji istovremeno veže dvije molekule ubikvitina²⁹.



Slika 26: Katalitički mehanizam enzima E1 (preuzeto iz ²⁹).

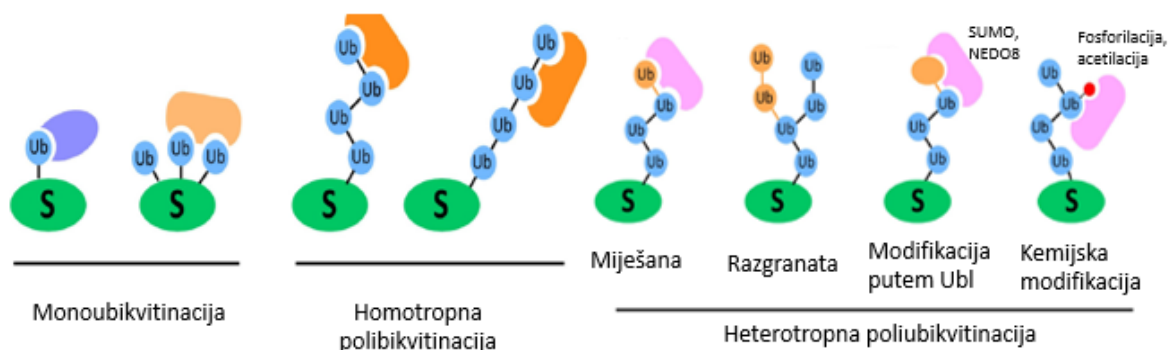
Sljedeći korak prijenos je ubikvitina s cisteina na enzimu E1 na enzim E2, uz istovremenu regeneraciju enzima E1^{27,29}. Katalitički mehanizam enzima E2 uključuje nukleofilni napad cisteina na tioestersku vezu ubikvitina i enzima E1, čime nastaje nova tioesterska veza između ubikvitina i E2. Ubikvitin u većini organizama ima samo jedan izozim E1, dok primjerice kvasac ima 11 izozima E2, a taj broj je i veći kod viših eukariota. Smisao ovog broja različitih E2 enzima pronalazi se u biološkoj ulozi ubikvitinacije pojedinih proteina. Naime, interakcija između pojedinih E2 i E3 izozima rezultira specifičnošću prema pojedinom supstratu, a i sama ubikvitinacija pojedinih proteina nema uvijek istu biološku ulogu. Velik broj mogućih kombinacija postojećih E2 i E3 enzima upućuje na to da se veliki broj proteina podvrgava ovoj PTM. Postavlja se pitanje o razlogu postojanja enzimske skupine E2. Naime, enzim E3 mogao bi izravno mogao bi izravno prenositi ubikvitin s enzima E1 na supstrat. Postoje najmanje dva objašnjenja, a oba se dotiču regulacije ove PTM. Interakcija E2 s E3 predstavlja dodatan korak u ovom mehanizmu, a što proces ima više koraka, postoji više potencijalnih mjesta za regulaciju samog procesa. Drugi razlog već je spomenut, a tiče se interakcije različitih izozima E2 i E3 koja pruža dodatnu razinu specifičnosti prema ciljnim proteinima (Slika 27).



Slika 27: Interakcijom različitih izozima E2 i E3 ostvaruje se specifičnost prema supstratu (preuzeto iz²⁷).

Zadnji korak procesa ubikvitinacije prijenos je ubikvitina vezanog na E3 na njegov konačan supstrat pod utjecajem enzima E3. Ovi enzimi kataliziraju nukleofilni napad amino skupine ciljnog proteina na ugljikov atom ubikvitina uključen u tioestersku vezu s enzimom E2, čime nastaje peptidna veza i ujedno se regenerira enzim E2. Već je spomenuta velika raznovrsnost izozima E3, što upućuje na velik broj supstrata koji se modificiraju ovom PTM. E3 imaju ulogu u sparivanju ubikvitiniranog E2 i ciljnog proteina. Osim ova tri tipa enzima, u pojedinim organizmima otkriveni su i enzimi E4, koji olakšavaju prijenos novih molekula ubikvitina na već ubikvitirane proteine, čime nastaju razgranati i nerazgranati ubikvitinski polimeri koji mogu biti dodatno modificirani drugim PTM.

Ubikvitirane proteine prepoznaju proteini s domenom za vezanje ubikvitina koji predstavljaju adaptore te dešifriraju tzv. ubikvitinski kod (Slika 28), odnosno strukturu i broj ubikvitina vezanih na protein, što za posljedicu ima usmjeravanje proteina u razgradne puteve, odnosno nerazgradne puteve, kao što je upala ili specifična lokalizacija proteina²⁸. Postoji nekoliko strukturno različitih tipova ubikvitinacije proteina.

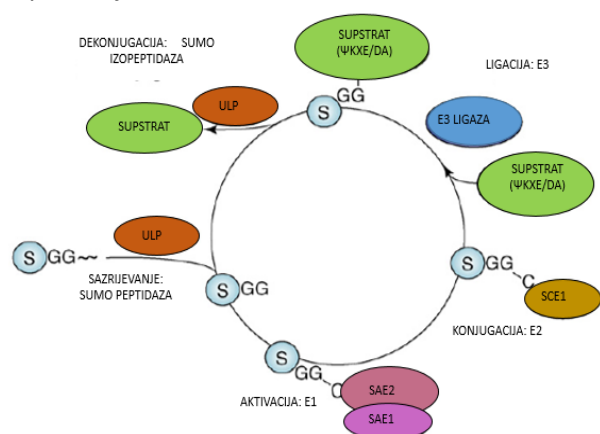


Slika 28: Ubikvitinski kod (preuzeto i prilagođeno prema ²⁸).

Najjednostavnija je monoubikvitinacija, odnosno konjugacija ciljnog proteina s jednom molekulom ubikvitina²⁸. Multi-monoubikvitinacija je konjugacija ciljnog proteina s nekoliko pojedinačnih molekula ubikvitina na nekoliko bočnih ogranka lizina. Pokazalo se da je učinak ovog tipa ubikvitinacije uglavnom regulacija aktivnosti proteina, analogno fosforilaciji, no i da se jedan dio ovako ubikvitiniranih proteina usmjerava u proteosomske degradativne puteve proteina. Homotropna poliubikvitinacija proces je sukcesivne ubikvitinacije ubikvitina već konjugiranog na ciljni protein na jednom od sedam lizina, odnosno na N-kraju, čime nastaju linearni lanci ubikvitina. Najčešći lizin na kojem se odvija ubikvitinacija ubikvitina je lizin na 48. poziciji ubikvitina. Najčešći učinak ovog tipa poliubikvitinacije usmjeravanje je u razgradne puteve, a od nerazgradnih puteva vrijedi spomenuti usmjeravanje transporta proteina te aktivacija protein-kinaza. Heterotropna poliubikvitinacija proces je ubikvitinacije već konjugiranih molekula ubikvitina, pri čemu nastaju razne razgranate poliubikvitinske strukture koje mogu sadržavati Ubl proteine te se na njima mogu odvijati i druge PTM, kao što je fosforilacija ili acetilacija. Broj poliubikvitinskih modifikacija ovog tipa, kao i njihove uloge, zaista je golem te uključuje signalizaciju, interakciju proteina sa šaperonima te usmjeravanje u lizosomske degradativne puteve. Ubikvitinacija je na pojedinim mjestima reverzibilna te se ponekad ubikvitini s ciljnog proteina uklanjaju djelovanjem enzima zvanih deubikvitinaze. To su proteaze koje hidroliziraju peptidnu vezu iza 76. glicina ubikvitina. Deubikvitinaze dijelimo na cisteinske proteaze i metaloproteaze. Njihova je uloga recikliranje ubikvitina, regulacija proteosomske degradacije proteina te regulacija aktivnosti proteina reguliranih vezanjem ubikvitina pa je ovaj tip proteaza analogan funkciji protein-fosfataza u regulaciji aktivnosti proteina fosforilacijom²⁸.

8.2. Sumoilacija

Sumoilacija je reverzibilna konjugacija proteina s malim modifikatorom srodnim ubikvitinu zvanom SUMO (engl. *small ubiquitin – related modifier*)³⁰. SUMO molekula stoga pripada ranije spomenutoj Ubl skupini proteina te je ubikvitinu slična po trodimenzijskoj strukturi i mehanizmu konjugacije na ciljne proteine, a od njega se uvelike razlikuje po slijedu aminokiselina (samo 20% homologije). SUMO protein je veći jer sadrži dodatne aminokiseline na N-kraju. SUMO ima vrlo različitu ulogu u usporedbi s ubikvitinom. Smatra se da je SUMO antagonist ubikvitina s obzirom na usmjeravanje proteina na degradativne puteve te da se u stanici odvija kompeticija između ubikvitinacije i sumoilacije proteina, što određuje stopu degradacije pojedinih proteina. Osim toga, sumoilacija ima i mnoge druge uloge, kao što su regulacija stanične aktivnosti, lokalizacija proteina u jezgri, a potom i subnuklearna lokalizacija, zatim stabilnost proteina te regulacija aktivnosti pojedinih transkripcijskih faktora presudnih u razvojnim procesima i hormonskoj regulaciji. Sumoilacija može imati induktivni ili reprimirajući učinak na aktivnost TF, a desumoilacija ima suprotan učinak. Također je pokazano da



sumoilacija ima značajnu ulogu u remodeliranju kromatina. Biokemijski mehanizam konjugacije SUMO molekule s ciljnim proteinom analogan je konjugaciji ubikvitina te se također sastoji od tri koraka. (Slika 29.) Desumoilaciju provode enzimi ubikvitinu slične SUMO – specifične proteaze (engl. *ubiquitin – like protease*, UBL). Zrele SUMO molekule nastaju procesiranjem prekursorske molekule SUMO proteazama na način da se nakon diglicinskog motiva odstrane ostale aminokiseline s C-kraja³⁰.

Slika 29: Sumoilacijski ciklus (preuzeto i prilagođeno prema ³⁰).

8.3. Razgradnja proteina

Nakon što je protein obavio svoju ulogu i stanica više nema koristi od tog proteina, takav se protein usmjerava na razgradnju^{3,24,27,28}. Razgradnja proteina onemogućuje nakupljenje nepotrebnih i defektnih proteina u stanici te omogućuje recikliranje aminokiselina za sintezu novih proteina u stanici. Razgradnja proteina uključuje hidrolizu peptidnih veza, čime se recikliraju aminokiseline koje su gradile taj protein te razgradnju ili recikliranje funkcionalnih skupina ili složenih molekula dodanih PTM na protein. Promet proteina u stanici vrlo je dinamičan proces. Stopa razgradnje najveća je za signalne proteine i transkripcijske faktore. Osim normalnih proteina koji više nisu potrebni stanici, razgradnja je bitan proces uklanjanja krivo smotanih proteina ili proteina s greškom uslijed mutacija ili greške nastale prilikom translacije. U eukariotskoj stanici postoje dva glavna sustava razgradnje proteina te oba ovise o prethodnoj ubikvitinaciji proteina koji će se usmjeriti u razgradne puteve. Sustav ubikvitin-proteasom (engl. *ubiquitin-proteasome system*, UPS) i autofagija u lizosomima dva su glavna sustava za razgradnju proteina u eukariotskih stanica. UPS funkcionira na način da se ubikvitirani protein usmjerava do velikog kompleksa koji zovemo proteasom. Autofagija je proces razgradnje proteina usmjerenih u lizosome. Osim proteina, ubikvitinacija usmjerava na razgradnju dotrajale mitohondrije (mitofagija), peroksisome (peksifagija) te strane mikroorganizme. Proteasom je veliki proteinski kompleks koji je većim dijelom očuvan u čitavom eukariotskom svijetu. Sastoji se od dva seta koji su građeni od po 32 podjedinice, koje se dijele na dvije funkcionalne cjeline, a to su sržna cjelina s podjedinicama koje imaju proteaznu aktivnost i regulacijske podjedinice, koje recikliraju ubikvitin i usmjeravaju protein u sržnu česticu na razgradnju. Smatralo se da se monoubikvitirani proteini ne usmjeravaju na proteosomsku razgradnju, no pokazalo se da to nije posve točno te da se određeni dio (multi)monoubikvitiranih proteina usmjerava u proteasom. To se uglavnom odnosi na male proteine, ne veće od 150 aminokiselina. Poliubikvitinacija proteina na način da se sukcesivno ubikvitinira ubikvitin na lizin 48 usmjerava gotovo sve proteine s ovim obrascem na proteosomsku razgradnju, što regulira gotovo sve stanične procese. Pojedini ubikvitirani proteini mogu izbjeći proteosomsku razgradnju te imaju tendenciju stvaranja proteinskih agregata u stanici. Takvi se agregati skladište u strukture zvane agresomi te se usmjeravaju u lizosom, gdje ih razgrađuje niz proteaza ovisnih o kiselim uvjetima pa ih zovemo kisele hidrolaze. Osim ovih, pojedini drugi ubikvitirani proteini usmjeravaju se na lizosomsku razgradnju, ovisno o obrascu ubikvitinacije i adaptorskim proteinima koji te obrasce prepoznaju i usmjeravaju ciljne proteine u lizosom. Ovo se posebno odnosi na poliubikvitinaciju preko lizina 63. Ovo nije jedina uloga lizosoma, već oni sudjeluju i u razgradnji proteina unesenih endocitozom te u mnogim drugim procesima.

9. ZAKLJUČAK

U ovom završnom radu opisano je smatanje proteina te sljedeće posttranslacijske modifikacije (PTM): procesiranje N-kraja, acetilacija, fosforilacija, glikozilacija, proteoliza te konjugacija s drugim proteinima. Ove PTM predstavljaju vrh ledene sante svih poznatih i karakteriziranih PTM. Zasad je poznato preko 200 različitih skupina pojedinih PTM, a gotovo svi poznati proteini se podvrgavaju barem jednoj PTM. Osim opisanih, primjeri PTM su: metilacija (prijenos metilne skupine sa S-adenozilmetionina na bočni ogranak lizina, odvija se na histonima u procesu heterokromatizacije), lipidacija (proces dodatka lipidnih molekula na proteine; poznata je O-kolesterilacija, N-palmitacija, S-farnesilacija i mnoge druge, a većina proteina koji se podvrgavaju ovoj PTM proteini su koji se nalaze na staničnoj površini te im je potrebno lipidno sidro koje će ga zadržati u staničnoj membrani), hidrosilacija, S-nitrozilacija (adicija NO na bočni ogranak cisteina, što ima uloge u signalizaciji), adicija nukleotida (npr. ADP-ribosilacija), biotinilacija te modifikacije aminokiselina kao što su citrulinacija, deamidacija i eliminacija. U PTM također je uključeno izrezivanje signalnih slijedova koji služe kotranslacijskom usmjeravanju proteina u endoplazmatski retikulum te kovalentno dodavanje prostetičkih skupina, kao što je slučaj hema kod hemoglobina i citokroma c. Iz proučavanja PTM jasno je da su samostalni, nemodificirani proteini poprilično inertne strukture te većina proteina svoju funkciju ne može obavljati dok se ne modificiraju. Ovo područje proteomike predmet je vrlo aktivnog istraživanja iz razloga što postaje sve jasnije da se PTM povezuju sa sve većim brojem bolesti zbog toga što je jasno da gotovo nema staničnog procesa neovisnog o PTM na način da nemodificirani proteini ne mogu obavljati svoju ulogu ili uslijed nemogućnosti postizanja odgovarajuće regulacije pojedinih procesa. Dobar primjer je protein p53. Ranije je spomenuto da je njegova uloga regulacija staničnog ciklusa i represija onkogeni te da je za njegovu aktivaciju odgovorna kombinacija fosforilacije i acetilacije. Uslijed nemogućnosti izvršavanja ovih PTM na proteinu p53 on gubi svoju ulogu te dolazi do poremećaja u staničnom ciklusu, što u konačnici dovodi do razvoja tumora. Važnost smatanja proteina ne treba posebno ni isticati jer je preduvjet funkcionalnosti svakog proteina njegovo pravilno smatanje. Uslijed poremećaja smatanja proteina također se javlja mnoštvo bolesti, osobitno neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest, obje rezultat nakupljanja nesmotanih proteina u neuronima središnjeg živčanog sustava.

Vrlo je jasno da su istraživanja posttranslacijskih modifikacija proteina budućnost molekularne biologije, medicine, ali i biotehnologije jer da bismo mogli proizvesti velike količine funkcionalnog proteina, potrebno je razumjeti cjelokupni životni ciklus proteina, od njegove biosinteze, preko smatanja i PTM do njegove degradacije. S vremenom će se golema mreža ovih modifikacija razjasniti te nam omogućiti efikasnije liječenje pacijenata, efikasniju proizvodnju željenih proteina koji su već procesuirani, a i iz znanstvenog pogleda, rasvijetliti mnoge stanične procese koji se odvijaju u stanicama, kako biljnim i životinjskim, tako i u vlastitim stanicama, iz čega ćemo bolje moći razumjeti što je to život, a u sklopu toga ćemo steći bolje razumijevanje o nama samima.

10. LITERATURNI IZVORI

1. ThermoFischer Scientific: Overview of Post-Translational Modifications, <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-post-translational-modification.html>, zadnje pristupljeno 04.09.2018.
2. Proteintech: Post-translational modifications: an overview, <https://www.ptglab.com/news/blog/post-translational-modifications-an-overview/>, zadnje pristupljeno 04.09.2018.
3. David L. Nelson & Michael M. Cox, 4. izdanje: Lehninger Principles of Biochemistry
4. Valerie Daggett & Alan Fersht, 2003: The present view of the mechanism of protein folding, *Nature reviews*, 4: 497-502
5. David Balchin, Manajit Hayer-Hartl, F. Ulrich Hartl, 2016: In vivo aspects of protein folding and quality control, *Science*, 353: 42-51
6. James E. Rothman & Randy Schekman, 2011: Molecular mechanism of protein folding in the cell, *Cell*, 146: 851-854
7. R. Martin Vabulas, Swasti Raychaudhuri, Manajit Hayer-Hartl, and F. Ulrich Hartl, 2010: Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2: 1-18
8. Pallav Kosuri, Jorge Alegre-Cabollada, Jason Feng, Anna Kaplan, Alvaro Ingles-Prieto, Carmen L. Badilla, Brent R. Stockwell, Jose M. Sanchez-Ruiz, Arne Holmgren & Julio M. Fernandez, 2012: Protein folding drives disulfide formation, *Cell*, 151: 794-805
9. John C. Lukesh, Kristen A. Andersen, Kelly K. Wallin and Ronald T. Raines, 2014: Organocatalysts of oxidative protein folding inspired by protein disulfide isomerase, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 43: 8598-8602
10. Drug discovery, <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/DrugDiscovery.html>, zadnje pristupljeno 04.09.2018.
11. Stefano Bonissone, Nitin Gupta, Margaret Romine, Ralph A. Bradshaw & Pavel A. Pevzner 2013: N-terminal protein processing: A comparative proteogenomic analysis, *Molecular & Cellular Proteomics*, 12.1: 14-27
12. Adrian Drazic, Line M. Myklebust, Rasmus Ree & Thomas Arnesen, 2016: The world of protein acetylation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1864: 1372-1401
13. Cartoon illustrating acetylation and deacetylation at the ε amino group of a lysine, [https://www.google.com/search?q=deacetylation&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiX08C5nqvcAhXFK1AKHXVGAuMQ_AUICigB&biw=1366&bih=626#imgsrc=iXVQe9qy1GHS3M](https://www.google.com/search?q=deacetylation&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiX08C5nqvcAhXFK1AKHXVGAuMQ_AUICigB&biw=1366&bih=626#imgsrc=iXVQe9qy1GHS3M;)., zadnje pristupljeno 04.09.2018.
14. Acetylation, <https://en.wikipedia.org/wiki/Acetylation>, zadnje pristupljeno 10.09.2018.
15. Fatima Ardito, Michele Giuliani, Donatella Perrone, Giuseppe Troiano & Lorenzo Lo Muzio, 2017: The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy, *International journal of molecular medicine*, 40: 271-280
16. Phosphorylation, <https://chemistry.tutorvista.com/biochemistry/phosphorylation.html>, zadnje pristupljeno 10.09.2018.
17. ThermoFischer Scientific: Phosphorylation, an overview, <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/phosphorylation.html>, zadnje pristupljeno 04.09.2018.
18. Protein phosphatase, https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_phosphatase, zadnje pristupljeno 04.09.2018.

19. Guyton and Hall, 13. izdanje: Textbook of Medical Physiology
20. Robert G. Spiro, 2002: Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds, Oxford University Press, 12: 43R-56R
21. Richard Strasser 2016: Plant protein glycosylation, Oxford University Press, 26: 926:939
22. Ludovic Mewono, Eric Nguema-Ona, Maxime Gotte, Abdul Salam Koroney, Marie-Laure Follet Gueye, Azeddine Driouich, Malte Vire-Gibouin, Sophie Aboughe-Angone, 2015: O-glycosylation in plant and mammal cells: the use of chemical inhibitors to understand the biosynthesis and function of O-glycosylated proteins, Plant Science Today, 2: 43-51
23. Dirk Bocsh, Alexandra Castilho, Andres Loos, Arjen Schots & Herta Steinkellner, 2013: N-glycosylation of plant-produced recombinant proteins, Current Pharmaceutical Design, 19: 1-7
24. Geoffrey M. Cooper & Robert E. Hausman, 3. izdanje: Stanica, molekularni pristup
25. Michael Ehrmann & Tim Clausen, 2004: Proteolysis as a regulatory mechanism, Annual Review of Genetics, 38: 709-720
26. OMICS international, https://www.google.com/search?q=insulin+processing&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwis44HTo6vcAhVBKVAKHSBSDakQ_AUICigB&biw=1366&bih=626#imgsrc=9nIAdN8Oe9hT0M, zadnje pristupljeno 04.09.2018.
27. Cecile M. Pickart & Michael J. Eddins, 2004: Ubiquitin: structures, functions, mechanisms, Biochimica et Biophysica Acta, 1695: 55-72
28. Yong Tae Kwon & Aaron Ciechanover, 2017: The ubiquitin code in the Ubiquitin-Proteasome system and autophagy, Trends in Biochemical Sciences, 1393: 1-14
29. Ubiquitin-activating enzyme, https://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin-activating_enzyme, zadnje pristupljeno 04.09.2018.
30. Kenji Miura, Jing Bo Jin & Paul M. Hasegawa, 2007: Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants, Current Opinion in Plant Biology, 10: 495-502

11. SAŽETAK (SUMMARY)

Posttranslacijska modifikacija svaka je preinaka proteina koja se odvija na proteinu nakon njegove biosinteze. Ove modifikacije uključuju smatanje proteina te mnogobrojne kovalentne modifikacije. Toliko su brojne da gotovo da nema proteina koji se ne podvrgava nekoj od ovih modifikacija. Trenutno je otkriveno preko 200 različitih posttranslacijskih modifikacija te su one postale težište istraživanja u proteomici iz razloga što postaje sve jasnije da su proteini bez ovih modifikacija inertne strukture koje ne mogu obavljati svoju biološku ulogu. Stoga je proučavanje ovih modifikacija vrlo bitno, ne samo iz znanstvenog pogleda, već iz medicinskih i biotehnoloških razloga te je budućnost istraživanja ovih modifikacija vrlo obećavajuća.

Post-translational modification is every protein modification that is happening after a protein is synthesized. These modifications include protein folding and numerous covalent modifications. Their number is so vast that there is almost no protein that isn't subjected to at least one of these modifications. Currently there are about 200 known post-translational modifications of proteins and they are increasingly becoming the centre of proteomic research because it is becoming evident that a protein without these modifications is nothing but an inert structure, unable to perform its biological function. Therefore, examination of these modifications is becoming more and more important, not only from a scientific perspective, but also from medical and biotechnological views and that is why the future of researching these modifications is very promising.